

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**PROTOCOLO CORTO DE SINCRONIZACIÓN DEL
CELO, MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
CLOPROSTENOL Y EL USO DEL “EFECTO MACHO”,
EN OVEJAS WEST AFRICAN EN CONDICIONES
TROPICALES (10°N)**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ignacio Contreras Solís

Bajo la dirección de los doctores
Antonio González de Bulnes
Antonio López Sebastián

Madrid, 2009

• ISBN: 978-84-692-1002-4

© Ignacio Contreras Solís, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

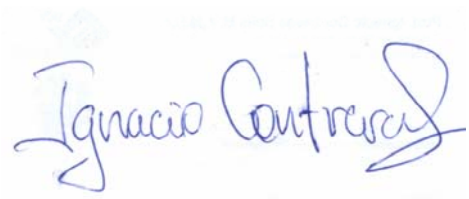


**Protocolo Corto de Sincronización del Celo,
mediante la Aplicación de Cloprostenol y el Uso
del "Efecto Macho", en Ovejas West African en
Condiciones Tropicales (10° N)**

Ignacio Contreras Solís

Madrid 2008

Trabajo que presenta el Licenciado en Veterinaria D Ignacio Contreras Solís para aspirar el grado de Doctor en Veterinaria



Fdo.: Ignacio Contreras Solís

Madrid, Abril de 2008.



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



D. Antonio González de Bulnes López y D. Antonio López Sebastián, investigadores del Departamento de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria,

CERTIFICAN:

Que la memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Ignacio Contreras Solís, con el título: *"Protocolo corto de sincronización del celo, mediante la aplicación de cloprostenol y el uso del "efecto macho", en ovejas West African en condiciones tropicales (10° N)"* ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Madrid, Abril de 2008

Fdo.: D. Antonio González de Bulnes López

Fdo.: D. Antonio López Sebastián



D^a Thaís del Valle Díaz Zambrano, profesora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela

CERTIFICA:

Que la memoria presentada por el Licenciado en Veterinaria D. Ignacio Contreras Solís, con el título: *"Protocolo corto de sincronización del celo, mediante la aplicación de cloprostenol y el uso del "efecto macho", en ovejas West African en condiciones tropicales (10° N)"* ha sido realizada bajo mi dirección en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (Maracay, Estado Aragua, Venezuela) y reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Maracay, Abril de 2008

Fdo.: D^a Thaís del Valle Díaz Zambrano

Mi alma está embelesada con la presencia de la primitiva naturaleza, desarrollada por si misma, dando creaciones de sus propios elementos por el modelo de sus inspiraciones íntimas, sin mezcla alguna de las obras extrañas, de los consejos ajenos, de los caprichos del espíritu humano ni el contagio de los crímenes y de los absurdos de nuestra especie.

Simón Bolívar

(Carta a José Joaquín Olmedo, 27 de junio de 1825)

Una vida pasiva e inactiva es la imagen de la muerte, es el abandono de la vida; es anticipar la nada antes de que llegue.

Simón Bolívar

(Carta al General. Sucre, 20 de enero de 1825)

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Bases Fisiológicas del Ciclo Sexual en la Oveja.....	4
3.1.1. Ciclo Sexual y Estacionalidad Reproductiva.....	4
3.1.2. Control Neuroendocrino del Ciclo Estral.....	5
3.1.3. Oogénesis y Foliculogénesis.....	7
3.1.4. Estructura y Función del Folículo Antral-Modelo Dos Células Dos Gonadotropinas.....	9
3.1.5. Dinámica Folicular Durante el Ciclo Estral en la Oveja.....	10
3.1.6. Ovulación.....	12
3.1.7. Crecimiento, Desarrollo y Función del Cuerpo Lúteo.....	13
3.2. Inducción y Sincronización del Celo de la Oveja.....	16
3.2.1. Métodos Farmacológicos.....	16
3.2.2. Métodos Naturales (“Efecto macho”).....	21
4. PLAN EXPERIMENTAL.....	23
4.1. Objetivo 1.....	24
4.1.1. Resultados.....	25
4.1.2. Discusión.....	29
4.2. Objetivo 2.....	32
4.2.1. Resultados.....	35
4.2.2. Discusión.....	39

4.3. Objetivo 3.....	41
4.3.1. Resultados.....	43
4.3.2. Discusión.....	47
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	50
6. CONCLUSIONES.....	55
7. CONCLUSIONS.....	56
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
9. ANEXOS.....	76
9.1 Anexo I (Material y Métodos).....	76
9.2. Anexo II (Índice de Tablas).....	79
9.3. Anexo III (Índice de Figuras).....	80
9.4. Anexo IV (Comunicaciones a Congresos).....	81
9.5. Anexo V (Publicaciones).....	89

AGRADECIMIENTOS

- *A la Universidad Central de Venezuela “la casa que vece las sombras” y en especial a su Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV), por el financiamiento aportado para llevar a cabo la realización y culminación de los estudios realizados en le presente disertación doctoral.*
- *Al Fondo Nacional de Investigaciones Científicas, Tecnológicas e Innovación, por el cofinanciamiento aportado, para la ejecución de los experimentos contemplados en la presente memoria.*
- *A los miembros de la Cátedra de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, por la confianza y el apoyo recibidos, durante los experimentos en Maracay.*
- *Al Dr. Antonio González de Bulnes López, quien, me permitió ingresar a su grupo de trabajo, y que por su talento, paciencia y orientación, permitieron elaborar, resolver los inconvenientes y llevar a feliz término, el presente trabajo....a él mis más sinceros agradecimientos de amigo!!!!.*
- *Al Dr. Antonio López Sebastián, quien por su, experiencia e importantes recomendaciones y sugerencias, enriquecieron la escritura de la presente tesis!!!.*
- *A mi amiga, la directora del “Instituto de Reproducción Animal de la UCV”, Dra. Thaís Díaz Z., quien pacientemente, contribuyó en el procesamiento de mis muestras, para la determinación de progesterona, los cuales fueron valiosos en la interpretación de los resultados....gracias nuevamente Thaís!!!!.*
- *Un agradecimiento muy especial a mi amiga, compañera de equipo (sobre todo durante aquellas largas noches de toma de muestras) la MV. Belkys J. Vásquez M., ya que con su apoyo físico y espiritual, fue persona “clave en la ejecución de cada una de las fases experimentales de esta tesis”. Igualmente, a mi amiga (a pesar de nuestras diferencias ideológicas....), compañera de equipo -pero en Madrid- y futura Doctora, Claudia Letelier, que por su calidad humana y profesional, ha sido un gran apoyo durante mi estancia en España. A ellas, mis más sinceros agradecimientos.*
- *A mi familia, en especial a Juan Pablo y Donnatella por su apoyo y consejos recibidos durante esta etapa de formación.*
- *Al equipo de trabajo del campo experimental del CENIAP y a los compañeros, Allan Caigua, Antonio Orellana, Pedro Cabrera y Edison Perozo, por su gran cooperación en la diferentes fases del desarrollo experimental de la tesis.*
- *A Raul, a Ernesto y a las muchachas del laboratorio, que por su apoyo desinteresado en el procesamientos de parte de las muestras, Gracias por su apoyo!!!!!!!!!!!!*

- *A mis amigos exbecarios y doctores ahora, Almudena Veiga y Adolfo Toledano, que me brindaron su apoyo a través de sus consejos y calor humano durante mis estudios en Madrid.*
- *A los amigos y profesores de de la Facultad de Veterinaria de la UCM, Teresa Encinas y José María Ross, por su amistad, consejos y apoyos recibidos durante mi estancia en Madrid.*
- *Al personal del Departamento de Reproducción Animal del INIA, España.*
- *Nuevamente a todos!!! GRACIAS!*

RESUMEN

El presente trabajo doctoral tuvo como objetivo el diseño y evaluación de un protocolo alternativo de sincronización del celo en ovejas cíclicas de pelo, mediante la administración de dos dosis bajas de cloprostenol y el empleo del “efecto macho”.

En una primera etapa, y en un primer experimento, se llevó a cabo el seguimiento de la dinámica de crecimiento folicular y luteal durante el ciclo sexual, con el fin de conocer el efecto del momento del ciclo sobre la funcionalidad de los folículos de tamaño preovulatorio; de forma indirecta, este estudio permitió la determinación del inicio de la actividad luteal y, así, establecer el momento más adecuado para inducir luteolisis mediante la administración de cloprostenol. Para ello, fueron evaluadas la dinámica folicular y luteal en quince ciclos sexuales; diez de estos (66,7%) presentaron, en una duración media de $16,8 \pm 0,2$ días, tres ondas de desarrollo folicular. El inicio de la primera (I), segunda (II) y tercera ondas (III) fueron los días $1,1 \pm 0,3$, $6,3 \pm 0,4$ y $10,7 \pm 0,5$, respectivamente; observándose que la duración de la onda II fue menor que la de la onda I ($5,7 \pm 0,4$ vs $6,9 \pm 0,3$ días; $P < 0,05$). Asimismo, la duración de la fase de crecimiento del folículo dominante fue menor en la ondas primera y segunda ($4,1 \pm 0,2$ y $3,4 \pm 0,3$ días, respectivamente) que en la tercera ($6,3 \pm 0,4$ días; $P < 0,0001$). El máximo diámetro alcanzado por estos folículos, fue menor en la onda II ($3,9 \pm 0,1$ mm; $P < 0,0001$) que en las ondas I y III ($5,0 \pm 0,2$ y $5,7 \pm 0,2$ mm). Durante la fase de desarrollo folicular correspondiente a la última onda, se observó una reducción ($P < 0,01$) en el número de folículos de 2-3 mm y totales. Por otra parte, los análisis de progesterona, demostraron la presencia de un cuerpo lúteo funcional (CL), desde el día 3 hasta día -2 del ciclo (respecto al día del celo). Asimismo, durante este período y en aquellos ovarios que presentaron CL, se observó una reducción en el número de folículos totales ($P < 0,01$) y grandes (5 mm; $P < 0,001$) por día del ciclo.

Seguidamente, en una segunda etapa, se procedió a llevar a cabo la valoración de la capacidad luteolítica de diferentes dosis (alta o estándar, 126 µg, media, 68,25 µg, y baja, 38,5 µg) de cloprostenol, así como de su efectividad para sincronizar celos y generar ovulaciones viables. Durante estos estudios, se observó que las tres dosis de cloprostenol fueron igualmente efectivas para producir luteolisis y sincronizar e inducir celos con ovulaciones. El estudio de la dinámica folicular durante la fase folicular inducida y de los cuerpos lúteos producidos, no mostró diferencias entre las tres dosis evaluadas; sin embargo, se observó un inicio del celo más temprano en las ovejas tratadas con la dosis alta que en aquellas tratadas con la dosis baja ($P < 0,05$). En base a estos resultados, se procedió, igualmente, a evaluar la actividad luteolítica, la sincronización de celo y ovulación así como los fenómenos periovulatorios producidos, en animales tratados con dosis altas o estándar y bajas, pero ajustando esta última a un volumen 0,5 ml (48,75 µg), para facilitar su administración. El estudio no encontró diferencias significativas entre grupos; sin embargo, se observó una mayor liberación de

LH en el grupo tratado con dosis baja, en términos de máxima concentración alcanzada durante el pico preovulatorio ($P < 0,05$) y concentración total, en términos de área bajo la curva (AUC, $P < 0,01$).

Posteriormente, en base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se valoró la respuesta -en cuanto a aparición del celo, pico preovulatorio de LH, ovulación y generación de cuerpos lúteos funcionales- a la administración de dosis bajas ajustadas de cloprostenol en fases muy tempranas del ciclo (días 3, 5 y 7 después de la ovulación); con la finalidad última de establecer un protocolo corto de sincronización de celos y ovulaciones viables. Los resultados obtenidos demostraron que la efectividad de dosis bajas de cloprostenol en el día 3 fue similar a las administradas en el día 7, en cuanto a su capacidad para inducir luteolisis y sincronizar celos. Sin embargo, se observaron diferencias entre dosis en relación al inicio ($P < 0,01$), momento de máxima concentración ($P < 0,001$) y final de la onda preovulatoria de LH ($P < 0,001$), parámetros que fueron más tempranos en las ovejas tratadas en el día 3. Igualmente el número y tamaño de los cuerpos lúteos generados fueron mayores en animales tratados en el día 3 y 5 ($P < 0,05$) que en los tratados en el día 7. En un segundo ensayo, se valoraron posibles mejoras en la sincronización del momento de la descarga preovulatoria de LH y la ovulación obtenidos con el tratamiento anterior, mediante su combinación con la utilización del “efecto macho”. Para ello, se valoró el momento de aparición del pico de LH y la ovulación en hembras tratadas con dos dosis de cloprostenol (con 7 días de separación) con o sin aplicación del “efecto macho”. El uso del “efecto macho” mejoró la respuesta, induciendo la ovulación todos los animales, mientras que en el grupo control solo ovularon el 63,6%; asimismo, indujo un inicio más temprano de la onda preovulatoria de LH ($P < 0,05$) y de la ovulación ($P < 0,001$). En un tercer ensayo, en que se valoró la aplicabilidad práctica del protocolo, se observó una que su uso y posterior aplicación de inseminación artificial a las 48 horas mejoraba la tasa de fertilidad respecto animales inseminados a las 55 horas o tratadas con progestágenos e inseminadas a las 55 horas (62,5; 44,0 y 47,4%, respectivamente); sin embargo, las diferencias no llegaron a alcanzar significación estadística.

El análisis conjunto de los experimentos anteriores señala que el uso de dosis bajas de cloprostenol -con 7 días de separación- y en unión con efecto macho permite una adecuada sincronización de celos. Por ello, este protocolo podría convertirse en una herramienta alternativa cuya incorporación en el manejo reproductivo de los rebaños ovinos favorecería los resultados de fertilidad de una forma natural, sin costo excesivo y siendo de fácil aplicación por parte de productores no tecnificados.

SUMMARY

The aim of present doctoral thesis was the design and assessment of an alternative estrous synchronization protocol in cyclic hair ewes, throughout the combined use of low doses of cloprostenol and the “ram effect”.

First experiment was performed to describe the follicular dynamics and luteal growth during estrous cycle, and to identify the effects of cycle stage on the functionality of the dominant/preovulatory follicles. This study also allowed to establish the dynamic of luteal activity during estrous cycle and to determine the most suitable moment for cloprostenol injection. Fifteen cycles, with a mean length of 16.8 ± 0.2 days were evaluated. Ten (66.7%) displayed a pattern of three waves of follicular development. The starting of first (I), second (II) and third waves (III) were days 1.1 ± 0.3 , 6.3 ± 0.4 and 10.7 ± 0.5 , respectively. The time-span of wave II was lowest than of the first wave (5.7 ± 0.4 versus 6.9 ± 0.3 days; $P > 0.05$). The growth phase of the dominant follicle was also shorter in waves I and II (4.1 ± 0.2 and 3.4 ± 0.3 days, respectively) than in wave III (6.3 ± 0.4 days; $P < 0.0001$). The maximum diameter of these follicles was smaller in wave II (3.9 ± 0.1 mm; $P < 0.0001$) than in I and III waves (5.0 ± 0.2 and 5.7 ± 0.2 mm). The number of smaller (2-3 mm) and total follicles declined ($P < 0.01$) at the last wave of follicular development. Functional corpora lutea (CL) were observed from Day 3 to -2 of the cycle (Day 0 being the day of estrus). In addition, the number of total ($P < 0.01$) and large (5 mm; $P < 0.001$) follicles/day of cycle declined in those ovaries that bearing CL during this period.

In a second part of this thesis, luteolytic activity of high/standard (126 µg), medium (68.25 µg) and low (38.5 µg) of cloprostenol doses was assessed; as well as the capability for synchronizing estrus and viable ovulations. These trials demonstrated that low dose was as effective as standard dose for producing luteolysis, synchronization of estrus and ovulations yielding to corpora lutea with normal lifespan. The study of follicular dynamics during the induced follicular phase, and corpora lutea features, did not show differences between the three evaluated doses; excepting an earlier onset of estrus in ewes treated with the higher cloprostenol dose ($P < 0.05$). On the basis of these results, low dose was adjusted to 0.5 ml (48.75 µg) for an easier handling, and periovulatory characteristics compared to standard doses were evaluated in detail. There were, again, no significant differences, but a greater LH releasing in terms of maximum concentration ($P < 0.05$) and total concentration, expressed as area under the curve (AUC, $P < 0.01$), of preovulatory LH surge in low adjusted doses.

Thereafter, we looked for designing a short-term estrous synchronization protocol. In this sense, synchronization of estrus, provulatory surge of LH, ovulation and presence of functional CL were assessed in cyclic hair ewes treated with lowest doses of cloprostenol at days 3, 5 and 7 after ovulation. The results obtained

demonstrated that the response to low doses injected at day 3 was similar to doses given at day 7. However, the onset ($P < 0.01$), ending ($P < 0.001$) and maximum concentration of preovulatory LH surge ($P < 0.001$) were earlier in sheep treated at day 3 than in those treated at day 7. Also, the number and size of viable corpora lutea were higher in ewes treated at days 3 and 5 ($P < 0.05$) than in those treated at day 7.

In view of these results, an experiment was performed to elucidate if the combination of the previous treatment with the “ram effect” would improve the synchronization of preovulatory LH release and the ovulatory response. Results indicated that “male effect” induced an early onset of the preovulatory LH surge ($P < 0.05$) and the ovulation ($P < 0.001$), with high ovulatory response (100% vs 63.6% in control ewes no exposed to “male effect”).

Finally, a last experiment was carried out to evaluate the applicability in practice of the proposed protocol. Ewes treated with cloprostenol and inseminated at 48 hours showed higher fertility rates than those inseminated at 55 hours or those treated with progestagens sponges (62.5, 44.0 and 47.4%, respectively), although differences did not reach statistical significance.

From previous results, the combined use of low doses of cloprostenol - given 7 days apart- and the “ram effect” allows the improvement of estrus synchronization response. Likewise, this protocol could become an alternative -green, clean, ethic and less expensive- tool to be incorporated in the reproductive management of the sheep flock.

1. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Según datos estadísticos de la FAO (2007), el 66,4 % de la población ovina mundial está concentrada en países en vías de desarrollo. Sin embargo, la productividad de los rebaños en estas regiones está muy por debajo de la que se registra en países desarrollados. Esta baja productividad viene determinada por causas de diversa índole, siendo básicamente atribuidas a limitaciones sanitarias y nutricionales; no obstante, otros factores inmediatos podrían relacionarse con una escasa utilización de prácticas de manejo reproductivo y de mejoramiento genético.

Los beneficios obtenidos con el uso de la sincronización del celo y la inseminación artificial son bien conocidos. Sin embargo, su implementación en países en vías de desarrollo se ve dificultada por factores económicos; principalmente, por el alto coste de los tratamientos y equipos necesarios. En concreto, los tratamientos destinados a la sincronización del celo, mediante el uso de dispositivos intravaginales impregnados con progestágenos, son poco accesibles para los productores tradicionales, debido a su elevado precio y escasa disponibilidad en el mercado. Por otro lado, el uso de hormonas progestativas está siendo limitado en los países desarrollados (Unión Europea, E.E.U.U.), con la finalidad de disminuir o evitar sus residuos en los productos animales, con el consiguiente riesgo para la salud humana, y evitar problemas sanitarios y de bienestar del animal; es de esperar que esta política se extienda a otros países.

Teniendo en cuenta la presencia de ciclos sexuales de forma continuada a lo largo del año una posible alternativa para la sincronización de los celos en las ovejas de pelo manejadas en condiciones tropicales, sería la inducción de la luteolisis, y del consiguiente celo, mediante el uso de análogos de la prostaglandina $F_{2\alpha}$. Este tratamiento, en primer lugar, evita la manipulación y riesgos de contaminación de los genitales externos de la hembra, siendo su aplicación por vía parenteral. Adicionalmente, los metabolitos de la prostaglandina son rápida y fácilmente excretables por vía pulmonar, en las 8 horas posteriores a su administración; por lo cual, la presencia de residuos en el organismo es prácticamente nula.

Sin embargo, este método presenta dos inconvenientes principales. En primer lugar, su costo, aunque menor que los progestágenos, sigue siendo una limitante para productores tradicionales y medianamente tecnificados en países en vías de desarrollo. En segundo lugar, la tasa de fertilidad obtenida es muy variable. Estudios previos de nuestro grupo y de otros laboratorios señalan que esto podría relacionarse con variaciones en el intervalo aplicación del tratamiento-celo-descarga preovulatoria de LH-ovulación, que parece estar determinado, a su vez, por el momento del ciclo en que

se aplica el tratamiento. Así, la administración de cloprostenol en fases tempranas del ciclo sexual se relacionaría con la aparición más temprana y agrupada de los fenómenos periovulatorios, lo que redundaría en una mayor fertilidad, especialmente si se utiliza inseminación artificial a tiempo prefijado.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo doctoral tuvo como objetivo el diseño y validación de un protocolo alternativo de sincronización del celo en ovejas cíclicas, mediante la administración de dos dosis de cloprostenol.

En una primera fase, como primer objetivo, se llevó a cabo el seguimiento de la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo sexual, con el fin de valorar y establecer las características del crecimiento folicular hasta el tamaño preovulatorio, a lo largo del ciclo sexual de estas ovejas, y así, de forma indirecta, este estudio permitiría la determinación del momento más adecuado para la administración de cloprostenol. Posteriormente, y para disminuir el coste de los tratamientos, se valoró la capacidad luteolítica de dosis bajas (en relación a la comercial) de cloprostenol y su efecto sobre el momento de aparición de los fenómenos periovulatorios. Asimismo, se valoró la respuesta (en cuanto aparición del celo, pico preovulatorio de LH y ovulación) a la administración de la dosis mínima efectiva de cloprostenol en fases muy tempranas del ciclo, con la finalidad última de establecer un protocolo corto de sincronización del celo.

En una segunda fase se buscó mejorar los resultados de sincronización del momento de la descarga preovulatoria de LH y la ovulación mediante la combinación del tratamiento anterior con la utilización del efecto de la presencia de los machos. A pesar de que el término “efecto macho”, es empleado en animales en anestro, la introducción de machos induce un aumento en la pulsatilidad de la LH y favorece la aparición del pico preovulatorio, por lo que podría favorecer los resultados de fertilidad de una forma natural, sin coste adicional y siendo de fácil aplicación por parte de los productores. Para llegar a ello, en primer lugar se valoró el momento de la descarga preovulatoria de LH y la ovulación en hembras tratadas con un protocolo corto de dos dosis de cloprostenol (7 días aparte) con o sin aplicación del “efecto macho” al momento de la segunda inyección. Finalmente, se procedió a evaluar la eficiencia, en cuanto a fertilidad tras la inseminación artificial, del protocolo “combinado” en comparación con un protocolo de sincronización del celo convencional empleando progestágenos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Previo estudio de la dinámica del crecimiento folicular y luteal en ovejas de pelo, manejadas bajo condiciones tropicales (10° N), diseñar un protocolo corto de sincronización de celos, basado en el uso del cloprostenol y “efecto macho”, y validarlo mediante su comparación con los protocolos habituales basados en la administración de progestágenos.

2.2. Objetivos Específicos

Para alcanzar el objetivo general, anteriormente planteado, se procedió a plantear los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las características del ciclo ovárico y el momento más adecuado para la lisis temprana del cuerpo lúteo, mediante la administración de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (cloprostenol).
2. Establecer y evaluar la dosis mínima efectiva de cloprostenol para la inducción y sincronización de celos y ovulaciones.
3. Evaluar la utilidad del uso del “efecto macho”, combinado con el protocolo de sincronización de celo, previamente diseñado en los puntos anteriores.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Bases Fisiológicas del Ciclo Sexual en la Oveja

3.1.1 Ciclo Sexual y Estacionalidad Reproductiva

En los mamíferos, el ciclo sexual se caracteriza por una sucesión de fases foliculares y luteales en el ovario, de forma sincronizada y repetitiva, y en aquellos de ciclo estral, por la presencia de un periodo de receptividad sexual de duración variable, que finaliza con la ovulación. (Kilen y Schwartz, 1998). En 1904, Marshall fue el primero en señalar la duración del ciclo estral de la oveja, describiendo una duración media de 16 a 17 días. Posteriormente, McKenzie y Terrill (1937) señalaron que el 90,4% de los ciclos estrales estudiados presentaban un rango de 14 a 19 días. En relación a las razas, no parecen existir diferencias atribuibles a este factor; ya que, tanto en las razas de lana o europeas como en las de pelo o tropicales, el ciclo estral se ha descrito con una duración media de $16,8 \pm 0,3$ (Acritopoulou et al., 1977) y $17,5 \pm 1,6$ días (Navarro y Torres, 1985), respectivamente.

En el ciclo sexual de la oveja se diferencian dos fases: a) una fase luteal o progestacional y b) una fase folicular o estrogénica. La fase luteal posee una duración aproximada de 14 días (Goodman e Inskeep, 2006), y se caracteriza por la presencia de uno o más cuerpos lúteos (CLs) en crecimiento o regresión, que secretan progesterona (P_4); se ha observado que el tamaño de tejido luteal se correlaciona con las concentraciones de P_4 en plasma sanguíneo (Bartlewsky et al., 1999a; González-Bulnes, et al., 2000). Estos niveles de P_4 alcanzan concentraciones máximas entre los días 5 y 13-14 del ciclo, momento en que se inicia la luteolisis (Bartlewsky et al., 1999a; Shanga et al., 2002). La fase folicular o estrogénica se caracteriza por la presencia de uno o más folículos en crecimiento continuo, hasta alcanzar la ovulación, los cuales secretan altos niveles de estradiol-17 β (E_2 -17 β) e inhibina. Asimismo, esta fase consta de un periodo de receptividad sexual denominado celo, cuya duración puede oscilar entre 10 y 53 horas (Navarro y Torres, 1985).

Estos ciclos sexuales se repiten de forma continua a lo largo de la vida reproductiva del animal; excepto en los periodos de anestro, de origen estacional, de gestación, de lactación o post-parto.

Los periodos de anestro estacional se relacionan con la característica actividad sexual estacional de la especie ovina, determinada por las variaciones de las horas de luz a lo largo del año (fotoperiodo) ajustada a la latitud en que se encuentren los

animales y modulada por la raza (Ortavant et al., 1988; Cerna et al., 2000, Arroyo et al., 2007). Las ovejas de razas europeas, y mantenidas en latitudes alejadas de la línea ecuatorial, presentan una mayor actividad sexual durante la época del año en que el número de horas de luz es menor. Este mecanismo garantiza la supervivencia de la especie, haciendo coincidir los nacimientos con la época más favorable del año (primavera), cuando la temperatura ambiental y la abundancia de alimentos permiten maximizar la supervivencia de los corderos (Lindsay et al., 1996). Contrariamente, el efecto de la estacionalidad se ve reducido a medida que nos acercamos a la línea ecuatorial, donde la duración de las horas de luz y de oscuridad llegan a igualarse (Carles y Kipngeno, 1986; Eloy et al., 1990).

En las ovejas de raza tropical, la estacionalidad sexual está sujeta principalmente a la disponibilidad de la oferta forrajera, determinada por dos estaciones: una de alta y otra de baja o escasa pluviometría (lluvia y sequía; González, 1991). No obstante, el efecto que pudiera ejercer el fotoperíodo sobre estas razas (como en la Pelibuey) en zonas subtropicales es todavía discutido. Existen trabajos, llevados a cabo en latitudes cercanas a los 19° N, donde se describe una relativa estacionalidad, que se traduce en una reducción de la actividad sexual durante los meses de marzo a abril (González et al., 1992; Cruz et al., 1994; Cerna et al., 2001; Arroyo et al., 2007). Por el contrario, estudios llevados a cabo en Venezuela (10° N) indican que las ovejas de la raza West African poseen una actividad sexual continua a lo largo del año (Torres y Navarro, 1985).

3.1.2. Control Neuroendocrino del Ciclo Estral

El control neuroendocrino del ciclo sexual de la hembra, se lleva a cabo mediante el eje hipotálamo-adenohipófisis, a través de la liberación de diferentes tipos de hormonas que controlan la función gonadal. Así, el hipotálamo produce la hormona liberadora de la gonadotropinas o GnRH, la cual ejerce su acción a nivel de la adenohipófisis, quien sintetiza y libera las hormonas foliculoestimulante (FSH) y la luteinizante (LH; Goodman et al., 2002). Así mismo la secreción endocrina ovárica de E_2 -17 β y P_4 (respectivamente de origen folicular y luteal), controla la secreción de GnRH en el hipotálamo (Gore-Langton y Armstrong, 1994). Complementariamente, existen otras hormonas y factores de crecimiento, tales como folistatina, activina, inhibina y factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), involucrados tanto en el control de la liberación de las gonadotropinas como en el desarrollo folicular (Padmanabhan et al., 2002).

A. *GnRH*: la hormona liberadora de las gonadotropinas, también llamada hormona liberadora de la LH (LHRH), es un decapeptido sintetizado por neuronas

especializadas del hipotálamo. Esta hormona es sintetizada y almacenada en gránulos que son transportados por axones que se dirigen hacia la zona externa de la eminencia media (Fink, 1988; Seeburg et al., 1987). Posteriormente es liberada en pulsos sincronizados, cuya frecuencia puede variar entre 30-120 minutos, hacia el sistema porta hipofisiario; estos pulsos estimulan la biosíntesis y secreción de FSH y LH por parte de las células gonadotropas de la adenohipófisis (Fink, 1988). Cada pulso de secreción de GnRH estimula un pulso de LH; sin embargo, la relación de estos pulsos con los de FSH está menos clara (Millar, 2005). En el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, el patrón de secreción de GnRH está regulado por las concentraciones de esteroides gonadales tales como P_4 , E_2 -17 β o testosterona en el caso del macho (Clarke y Pompolo, 2005).

B. FSH y LH: hormonas de naturaleza glicoproteica, compuestas por dos subunidades (α y β) unidas por enlaces no covalentes. Ambas subunidades son sintetizadas por las células gonadotropas de la adenohipófisis. La subunidad α es común para ambas hormonas, mientras que la β es específica para cada una de ellas (Childs, 2006). La FSH es la encargada de estimular el desarrollo folicular ovárico, actuando a nivel de las células de la granulosa del folículo y estimulando la activación de las aromatasas, las cuales terminan el proceso de síntesis desde androstenediona hasta estradiol (Hsueh et al., 1984). La LH estimula la síntesis de androstenediona por parte de las células de la teca interna durante el desarrollo folicular. Además, es la responsable de estimular la ovulación y la formación y mantenimiento del CL (Niswender et al., 1981; Hansel y Convey, 1983).

C. Hormonas Esteroideas Ováricas: como se mencionó anteriormente, el E_2 -17 β y la P_4 , son los esteroides más importantes en el control del ciclo sexual de la hembra. Dentro de los estrógenos más importantes del fluido folicular, se encuentran el E_2 -17 β y la estrona (E_1). Su síntesis se realiza en las células de la granulosa, a través de la aromatización de la androstenediona. El E_2 -17 β induce la fase de receptividad sexual o celo durante el ciclo sexual de las hembras de los mamíferos (Gore-Langton y Armstrong, 1994); asimismo, controlan la secreción de la FSH por medio de un mecanismo de retroalimentación (Padmanabhan et al., 2002). La P_4 es el principal progestágeno producido, a nivel ovárico, tanto por la teca interna (solo en el proceso de síntesis y no como secreción) del folículo como por el CL. Su principal función es preparar el útero para la implantación del embrión y el mantenimiento de la gestación (Hansel y Convey, 1983; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Reynolds y Redmer, 1999).

D. Activina, inhibina y follistatina: son péptidos producidos, principalmente, en las células de la granulosa del folículo ovárico, que regulan el crecimiento folicular controlando la liberación de FSH. La activina e inhibina son dímeros que constan de una subunidad α y dos β (β_A y β_B); ambos dímeros están relacionados con el factor de crecimiento transformador β (TGF- β). La inhibina tiene como función suprimir la

producción y la secreción de FSH, mientras que la activina tiene el efecto contrario (Ying, 1988). En relación a la folistatina, es un monómero que se une a la subunidad β de la activina y de la inhibina, modulando su acción sobre la secreción y liberación de FSH (Robertson, 1992; Phillips y de Kretser, 1998).

E- Factores de crecimiento: Los factores de crecimiento se clasifican según su estructura y actividad biológica; entre los principales implicados en la actividad ovárica destacan el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), TGF- β , factores de crecimiento hematopoyético (citoquinas) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Estos factores, están directamente involucrados en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Monget y Monniaux, 1995; Webb et al., 1999).

F- Prostaglandinas: son hormonas derivadas del ácido araquidónico; la más importante para el mantenimiento de la ciclicidad sexual es la prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}). Su principal fuente de producción es el endometrio, a través de la prostaglandina endoperoxido H sintetasa (PGS; Thatcher et al., 1995). En las etapas finales del ciclo estral, se produce una síntesis de receptores endometriales, y la oxitocina, proveniente del CL, estimula la producción de PGF_{2 α} (Flint et al., 1986; Thatcher et al., 1995). Posteriormente, la PGF_{2 α} sintetizada es secretada al torrente sanguíneo, a través de la vena uterina y es transferida, por un mecanismo de contracorriente, mediante anastomosis desde la vena uterina hacia la arteria ovárica para ejercer su acción luteolítica por disminución del flujo sanguíneo local, con la consiguiente disminución de la producción de P₄ (Knickerbocker et al., 1988; Stellflug et al., 1997; Juengel y Niswender 1999).

3.1.3. Oogénesis y Foliculogénesis

La oogénesis, termino utilizado para definir el desarrollo y crecimiento del oocito, tiene su inicio en el periodo embrionario; las células germinales primordiales, células indiferenciadas que se originan en la porción dorsal del saco vitelino, migran para ubicarse en los cordones sexuales de las crestas gonadales, alrededor del día 20 de gestación en la oveja (Mauleon, 1978; McNatty et al., 1995). Estas células germinales primordiales se diferencian en oogonias que se dividen mitóticamente, a partir del día 23 hasta el 120 de gestación, para dar lugar al oocito primario (célula diploide). Posteriormente, desde el día 55, los oocitos primarios sufren la primera división reduccional o mitótica deteniéndose en el diplotene de la profase I de la meiosis. En la vida reproductiva adulta, inmediatamente después de la ovulación, se completa la meiosis I para dar paso al oocito secundario (célula haploide) y al primer corpúsculo

polar. En este momento el oocito detiene su división en la metafase II de la meiosis; esta se reiniciará en el momento de producirse la fecundación (McNatty et al., 1995).

Alrededor del día 75 de gestación, la población de oogonias alcanza su máximo número (hasta 900.000), para posteriormente reducirse en un 80% a los 90 días de gestación, habiéndose descrito una población de hasta 170.000 células germinales a los 100 días. Paralelamente aparecen las primeras oogonias, rodeadas por una capa de células planas, y que darán origen a los folículos primordiales. Las etapas finales de la vida intrauterina del feto ovino (días 120 y 135) el ovario se caracteriza por poseer tanto oogonias como folículos en desarrollo (Zuckerman y Baker, 1977; McNatty et al., 1995).

La foliculogénesis es definida como el proceso por el que un folículo evoluciona desde su estado primordial (con unos 100 μ m de diámetro) hasta el ovulatorio (> 4 ó 5 mm, dependiendo de la tasa de ovulación); tiene una duración aproximada de 180 días en la oveja (Cahill y Mauleon, 1981); de ellos, unos 40 corresponden a la fase de crecimiento del folículo antral, que es el comprendido desde la formación del antro (folículos entre 0,2 y 0,4 mm de diámetro) hasta el estadio preovulatorio (Turnbull et al., 1977). Este crecimiento no se produce de forma individualizada, sino en grupos de folículos, destacando la presencia de una marcada jerarquía en la población de folículos antrales. Así, se han descrito tres grupos de folículos: el primero comprende una población de 20 a 30 folículos de 2 a 3 mm (los cuales son gonadotropo-dependientes o dependientes de la FSH), el segundo comprende entre 1 y 4 folículos mayores de 3,4 mm, los cuales dependen tanto de la FSH como de la LH para su crecimiento; el tercero está formado por un número variable de folículos ovulatorios, cuyo número está determinado por la tasa de ovulación intrínseca de la raza y que han reemplazado sus receptores de FSH por los de LH para su desarrollo final (Campbell et al 1995; Webb et al., 1999).

El folículo ovulatorio en la oveja se caracteriza por poseer un diámetro > 4 mm y estar altamente vascularizado, estrogénicamente activo y poseer varias capas de células de la granulosa, las cuales poseen, a su vez, receptores para LH (Webb y Engeland, 1982). Este folículo ovulatorio puede ser capaz de ovular, siempre y cuando se encuentre en fase folicular y se produzca, paralelamente, un pico preovulatorio de LH (Driancourt et al., 1988; Price y Webb, 1989); en caso contrario, este folículo de tamaño ovulatorio entra en proceso de atresia, dando paso al desarrollo de otro folículo reclutado del grupo de folículos que responden a las gonadotropinas, que reemplaza la anterior (Campbell et al., 1995).

3.1.4. Estructura y Función del Folículo Antral-Modelo Dos Células Dos Gonadotropinas

En el folículo antral se diferencian dos sistemas celulares, implicados ambos en la biosíntesis de E_2 -17 β : las células de la granulosa y las células de la teca interna; ambos grupos celulares están separados por una lámina basal (Hansel y Convey, 1983; Lobb y Dorrington, 1992).

Tal como se describió anteriormente, la actividad de las células de la teca interna y de la granulosa, depende de la acción específica de la LH y la FSH, respectivamente (Moor, 1977; Hansel y Convey, 1983; McNatty et al., 1999), lo que ha llevado a proponer por un modelo denominado con el nombre de “dos células-dos gonadotropinas” (Fortune y Quirk, 1988).

En este sentido, la información obtenida en experimentos llevados a cabo *in vitro* para evaluar la capacidad esteroideogénica de las células foliculares de rumiantes indica que las células de la teca secretan andrógenos, principalmente en forma de androstenediona, pero son incapaces de convertir este esteroide a estradiol (Fortune, 1986; Fortune y Quirk, 1988). Curiosamente, la secreción de P_4 por parte de las células de la granulosa es aumentada tanto por la acción de la LH como de la FSH (Fortune, 1986). Sin embargo, las células de la granulosa son incapaces de convertir los progestágenos a estradiol, debido a que ellas secretan estradiol solo cuando un andrógeno aromatizable es incluido en el medio de cultivo (Fortune y Hansel, 1979; Fortune, 1986).

Fortune y Quirk (1988), mencionan que aparte de la producción folicular de estradiol, tanto las células de la granulosa como de la teca poseen otro tipo de interacción. Estos autores señalan que las células de la granulosa, indirectamente, contribuyen a la producción folicular de andrógenos, suplementando a las células de la teca con precursores de progestágenos, que éstas últimas emplean para aumentar la producción de progestágenos. Cuando se usan cultivos aislados de células tecales con varias dosis de pregnonolona o progesterona, éstas aumentan la producción de androstenediona (Fortune, 1986). La pregnonolona es mucho más efectiva como sustrato para producir androstenediona que la progesterona, siendo esta secreción aumentada en presencia de LH. Estos resultados sugieren que las células de la granulosa aumentan la secreción de androstenediona por parte de las células tecales por la secreción de la pregnonolona. Estos hallazgos confirman que la interacción entre las células de la teca y de la granulosa en relación a la esteroideogénesis es más compleja que una simple provisión de andrógenos (o precursor de estradiol) por parte de las células tecales hacia las células de la granulosa (Fortune y Quirk, 1988).

Por último, el estradiol producido por los folículos ovulatorios actúa como mensajero para regular el desarrollo y la función del folículo. Esto es debido a que el

estradiol actúa como mitógeno sobre las células de la granulosa y actúa con la FSH para inducir la aparición de receptores para LH en estas células (Richards, 1980); así, aumentar la secreción de este esteroide (Fortune y Quirk, 1988). A su vez, estos aumentos de estradiol inhiben la secreción de progesterona por inhibición de la conversión de pregnonelona a progesterona en ambas células. Sin embargo, la conversión de pregnonelona a andrógenos no es inhibida, posiblemente debido a que la enzima encargada de convertir la dihidroepiandrostenediona en androstenediona es menos sensible al efecto inhibitorio del estradiol (Fortune y Quirk, 1988).

3.1.5. Dinámica Folicular Durante el Ciclo Estral en la Oveja

La dinámica folicular es definida como un proceso continuo de crecimiento y regresión de folículos antrales, que finaliza en la atresia o la ovulación (Lucy et al., 1992). Inicialmente, existían discrepancias en cuanto a la forma de como se producían estos patrones de crecimiento y regresión/ovulación en la oveja, ya que en un principio se creía que el crecimiento del folículo era continuo a lo largo del ciclo tal como lo señalaron Lahlou-Kassi y Mariana (1984). Posteriormente, y con el desarrollo de la ecografía transrectal adaptada para la especie ovina, Schrick et al. (1993) y Lopez-Sebastian et al. (1997), observaron que la selección y crecimiento de los folículos se realiza en forma continua a lo largo del ciclo sin evidencia firme de presentar un patrón organizado de crecimiento y regresión a lo largo del ciclo. Por el contrario, los trabajos llevados a cabo por Ginther y Kot en cabras (1994) y Ginther et al., en ovejas (1995), valorando exclusivamente los folículos que llegan a alcanzar un tamaño $\geq 5\text{mm}$ señalaban el desarrollo en ondas, que coincide con el descrito en la vaca. Estudios posteriores armonizaron ambas posturas describiendo el desarrollo de ondas primarias y secundarias (Adams, 1999; Viñoles et al., 1999; Evans et al., 2000, 2003). En este sentido, cada onda esta compuesta por 3 etapas, denominadas reclutamiento, selección y dominancia (Goodman y Hodgen, 1983). El reclutamiento implica la capacidad de un grupo de folículos para responder a las gonadotropinas secretadas en la hipófisis, posteriormente, dependerá de ellas para su crecimiento. La selección es el proceso por el cual algunos de los folículos reclutados son seleccionados para continuar su crecimiento hasta estadios preovulatorios, mientras el resto entran en atresia. La dominancia es aquella etapa en que un folículo adquiere características morfológicas (mayor tamaño) y funcionales, que permiten incrementar su propio crecimiento e inhibir, a su vez, el crecimiento de aquellos folículos (subordinados) que emergieron con él (Webb, 1999).

En la oveja, el número de ondas foliculares desarrolladas durante el ciclo estral es variable. En este sentido, Ginther et al. (1995) señalan un número medio de 4 ondas foliculares en ovejas de la raza Polipay; otros estudios como el de Leyva et al. (1998),

describen un número menor de ondas (2 en el 29% de los animales y 3 en el 71%) en ovejas de la raza Suffolk. Cabe señalar que estos datos, hasta los momentos, proceden de razas ovinas de lana, ya que la dinámica folicular en las ovejas tropicales o razas de pelo no ha sido descrita en la actualidad.

El crecimiento folicular está determinado por los patrones de secreción de FSH (Driancourt, 1991, Adams et al. 1992); aumentos en la secreción de FSH provocan procesos de reclutamiento folicular (Picton et al., 1990). A su vez, los folículos en crecimiento secretan estradiol, inhibina y folistatina, que provocan un descenso en la liberación de FSH (Gibbons et al., 1997; 1999; Padmanabhan et al., 2002), iniciando el proceso de selección que culmina en el proceso de dominancia.

La dominancia folicular puede ser ejercida a dos niveles. El primero se denomina sistémico, indirecto o pasivo, y se ejerce a través de la reducción de los niveles de FSH hasta niveles muy bajos; los folículos no dominantes entran en atresia y desaparecen. Este efecto se produce por un mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen la inhibina y el estradiol secretados por los folículos de mayor tamaño (Martin et al., 1988, Driancourt, 1991). El segundo se denomina local, directo o activo, y consiste en un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de los folículos menos desarrollados, a través de la secreción de sustancias en la sangre que reducen la sensibilidad de estos folículos a la FSH. Este último ha sido tradicionalmente descrito en vacas (Driancourt, 1991), y recientemente en ganado ovino (González-Bulnes et al., 2004).

Por otro lado, los fenómenos de diferenciación de los folículos dominantes, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional, no sólo interfieren en el desarrollo de los folículos subordinados, sino que estimulan su propio desarrollo. Esto se lleva a cabo tanto por la secreción de estradiol, como de factores de crecimiento que amplifican la respuesta del folículo dominante a las gonadotropinas (Armstrong y Webb, 1997; Webb et al., 1999). Inicialmente, el estradiol ejerce una interacción con la FSH, a nivel folicular (Hsu y Hammond, 1987), estimulando la síntesis y secreción de IGF-I; este factor ejerce una actividad autocrina en estos grandes folículos (Echternkamp et al., 1990). A su vez, este aumento de la producción del IGF-I es paralelo al aumento de la receptividad de las células de la granulosa a este factor de crecimiento; pudiendo estimular, a través de la aromatización, una mayor producción de estradiol, (Adashi et al., 1985a), así como un mayor número de receptores para LH (Adashi et al., 1985b). El IGF-I juega, de esta forma, un papel destacado sobre el mantenimiento de la fase de dominancia. Asimismo, existen otros factores tales como el TGF- β y la activina, que regulan la actividad esteroideogénica y la proliferación de las células de la granulosa, respectivamente (Knight y Glistler, 2001) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), las cuales están asociada a la maduración del folículo y al aumento de la tasa de ovulación (Montgomery et al., 2001; Monget et al., 2002; Webb et al., 2003).

3.1.6. Ovulación

La ovulación es un proceso reproductivo indispensable para la propagación de las especies (Hartman, 1932; Espey, 1994). En esencia, consiste en la ruptura de la pared del folículo ovárico y la liberación de su contenido, incluyendo el oocito maduro, para dar lugar a un cuerpo lúteo (Pineda, 1989).

El inicio de los pasos previos a la ovulación o proceso ovulatorio varía entre las diferentes especies de mamíferos (Espey, 1994). En el caso de la oveja, Stellflug et al. (1997) señalan que su inicio ocurre entre 21 a 33 horas después del comienzo del celo; caracterizándose por presentar cambios en la ultraestructura de la pared folicular, específicamente a nivel del ápex o estigma. Estos cambios se inician ya desde aproximadamente una hora antes de la ruptura folicular (Espey, 1967a, 1991; 1994).

En el folículo ovulatorio pueden distinguirse cinco capas celulares, que son, desde la mas externa a la mas interna: a) la superficie epitelial, compuesta por células cuboides; b) la túnica albugínea, constituida por una cubierta de fibroblastos y colágeno que, a su vez, rodea a todo el ovario y que presenta entre 5 y 7 capas de células; c) la teca externa, que está formada por cinco a siete capas de células; d) la teca interna, que tiene un grosor de 2 células y e) el estrato granuloso, que consta de unas cinco a siete capas de células, excepto en donde las células forman un pedestal denominado *cumulus oophorus*, que sostiene al oocito. Asimismo, existe una membrana basal que separa a las células de la granulosa de la teca interna. Los capilares de la teca interna no penetran dicha lámina basal para entrar en la granulosa, con lo que ésta se convierte en un estrato avascular. Una característica importante de la granulosa, es que elabora una red de uniones “gap” que une a las células, formando un sincitio funcional. Los intercambios nutricionales y electrolíticos de este sincitio pueden permitir que la granulosa influya sobre el metabolismo del oocito y *viceversa* (Espey, 1994).

Los cambios más importantes que se producen durante la ovulación son aquellos que ocurren en el tejido conectivo de la túnica albugínea y en la teca externa (Tsafiriri y Dekel, 1994). Así, en el momento de la ovulación, se establece la disolución de la matriz extracelular y la disociación del colágeno de la teca (Espey, 1967a,b). Estos cambios son acompañados por un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, teniendo como resultado la salida de las células sanguíneas de los capilares y la formación de edema en el tejido folicular (Bjersing y Cajander, 1974; Parr, 1974; Abisogun et al., 1988). Estos cambios son inducidos principalmente por la LH a través de los eicosanoides -sustancias derivadas de ácidos grasos poliinsaturados, de 20 átomos de carbono- los cuales, entre otras funciones, está la de modular la microcirculación (Janson, 1975; Tsafiriri y Dekel, 1994).

Existen otros factores involucrados en la ovulación. Entre ellos destacan el factor activador de las plaquetas (PAF), el sistema renina-angiotensinógeno, diversas quininas y la histamina, los cuales actúan como agentes vasoactivos. El PAF es un potente fosfolípido bioactivo, que induce respuestas biológicas por parte de las plaquetas y leucocitos y cambios marcados en la permeabilidad vascular, presión sanguínea y función cardíaca y pulmonar (Tsafiriri y Dekel, 1994). El sistema renina-angiotensinógeno ovárico, el cual es gonadotropo-dependiente, participa en el proceso ovulatorio, a través de un marcado efecto hipertensivo (Speth et al., 1999). Por otro lado, las quininas han sido relacionadas con la ovulación a través de la vasodilatación local y del aumento de la permeabilidad vascular (Tsafiriri y Dekel, 1994), mientras que la histamina, liberada por la degranulación de los mastocitos a lo largo de los vasos sanguíneos de los ovarios, contribuiría a la vasodilatación a nivel de los folículos ovulatorios (Espey, 1994).

Por otra parte, la ruptura de la pared del folículo ovulatorio, también es producto de cambios sufridos en la matriz extracelular, específicamente, a nivel del tejido conectivo y fibras colágenas de la túnica albugínea y teca externa; dichos eventos son producto de la acción de un conjunto de enzimas proteolíticas - dependientes del calcio y el zinc- denominadas metaloproteinasas. Entre las metaloproteinasas involucradas en el proceso ovulatorio están las colagenasas, gelatinasas (A y B), metaloproteinasas ligadas a membranas así como el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (Smith et al., 1999).

A las reacciones anteriormente señaladas durante el proceso ovulatorio se suma la acción directa que ejerce el óxido nítrico, sobre la activación de las ciclooxigenasas y, en consecuencia, la síntesis de prostaglandinas; incrementando así la reacción inflamatoria durante la ovulación (Dixit y Parvizi, 2001).

También durante el proceso ovulatorio se produce la migración de los neutrófilos y los eosinófilos del compartimiento vascular en los folículos preovulatorios y la extravasación sanguínea, con numerosas plaquetas adheridas al endotelio vascular dañado (Cavender y Murdoch, 1988), lo que facilita el aumento de la presión hidrostática y, como consecuencia, la ruptura de la pared folicular (Espey 1994; Tsafiriri y Dekel, 1994).

3.1.7. Crecimiento, Desarrollo Y Función del Cuerpo Lúteo

El Cuerpo Lúteo (CL) es una glándula endocrina temporal formada por células provenientes del folículo ovulatorio. El parénquima luteal es un complejo de células luteales denominadas grandes y pequeñas, que provienen de las células de la granulosa

y de la teca interna, respectivamente. El estroma está constituido por fibroblastos, músculo liso vascular, pericitos y células endoteliales (Niswender y Nett, 1994). La principal función del CL es secretar P_4 para mantener una posible gestación (Niswender et al., 1985; Reynolds et al., 1994). Además, el CL secreta, en pequeñas cantidades, péptidos tales como relaxina, oxitocina, vasopresina e inhibina (Field, 1991).

En caso de que no se produzca gestación, el CL sufrirá regresión y dará paso a una nueva ovulación. Por ello, la dinámica de crecimiento del CL se describe como un patrón de crecimiento y regresión (Jablonka-Shariff et al., 1993; Reynolds et al., 1994; Reynolds y Redmer, 1999). En la oveja, el CL tiene un peso inicial de 30 a 40 mg, inmediatamente después de la ovulación, y alcanza un peso de 750 mg en, aproximadamente, 12 días después de la ovulación; esto representa un aumento de peso de casi 20 veces en relación al peso inicial. Durante esta fase de desarrollo, el CL posee un periodo de crecimiento rápido, de 60 a 70 horas de duración, durante el cual dobla su masa; esta velocidad de crecimiento es sólo igualada por algunos tumores de crecimiento rápido (Baserga, 1985; Reynolds et al., 1994). En general, el peso del CL está relacionado positivamente con el tamaño corporal en las diferentes especies de mamíferos; pero, por el contrario, existe una relación inversa entre el tamaño del CL y el número de CLs (Reynolds et al., 1994)

El crecimiento y función del CL depende prácticamente del desarrollo vascular; siendo este a su vez dependiente de factores angiogénicos. Entre ellos, los principales son el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento vasculoendotelial, siendo este último el de mayor importancia sobre el desarrollo vascular del CL. De igual forma, las uniones “gap”, que establecen comunicaciones entre las células luteales grandes y pequeñas, están también involucrados en el desarrollo y funcionamiento (esteroidogénesis) del CL, ya que se ha demostrado una relación entre la producción de P_4 y el número de uniones GAP (Reynolds et al., 1992, 1994, Redmer y Reynolds, 1996; Grazul-Bliska et al., 1997, 1998; Borowczyk et al., 2007).

La función principal del CL es la síntesis y secreción de progesterona, a partir del colesterol. El colesterol es sintetizado por el hígado y pasa al torrente circulatorio de donde es captado por la célula luteal, que lo almacena y posteriormente procesa por medio de enzimas. El colesterol es transportado por el citoesqueleto de la célula hacia la membrana interna de la mitocondria por una proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) y por un receptor periférico de la benzodiazepina (PBR). Una vez en la mitocondria, el sistema enzimático del citocromo P_{450} convierte el colesterol en pregnonolona; la cual, a su vez, pasa al retículo endoplásmico liso, para ser convertida en P_4 por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -DHS). Cabe destacar que hasta un 80% de la P_4 producida por el CL proviene de las grandes células luteales (Juengel y Niswender, 1999).

La producción de P_4 por unidad de tejido funcional, por célula, es similar en las etapas iniciales y en las etapas avanzadas de crecimiento del CL. Esto sugiere que las menores concentraciones sistémicas de P_4 correspondientes a la etapa inicial de formación y crecimiento del tejido luteal se deben más a una menor cantidad de tejido luteal y a una baja vascularización que a una reducida capacidad de producir P_4 *per se* (Reynolds et al., 1994).

El mantenimiento de la función luteal se debe principalmente a la acción de la LH y la hormona de crecimiento; sin embargo, existen otras sustancias involucradas, tales como el IGF-I, la PGE_2 y la PGI_2 , que también incrementan la producción de P_4 (Juengel y Niswender, 1999).

Cuando no se establece la gestación, desde el endometrio se inician los procesos que conducen a la lisis del CL. Esta se produce por la acción de la $PGF_{2\alpha}$, la cual se sintetiza y libera en el endometrio uterino. La producción de $PGF_{2\alpha}$ es, a su vez, inducida por la oxitocina sintetizada por el CL, la cual ejerce su acción a través de receptores localizados a nivel del endometrio materno (Wathes y Lamming, 1995).

El mecanismo de acción de la $PGF_{2\alpha}$ se basa, por una parte, en una reducción del flujo vascular (Niswender y Nett, 1994), y por otra, en una disminución de la producción de P_4 a través de la acción de segundos mensajeros (principalmente la proteinquinasa C, PKC; Wiltbank et al., 1991). Esta disminución de la esteroidogénesis se produce mediante la interrupción del mecanismo de transporte del colesterol, hacia y a través de la mitocondria, y mediante una disminución del ARNm que codifica la 17 β -dihidroxisasa (17 β -DHS, Juengel y Niswender 1999).

Estos procesos que tienen lugar durante la luteolisis coinciden con la fase de crecimiento de una onda folicular, el conjunto de ambas constituyen la fase folicular del ciclo sexual. Esta se caracteriza por una disminución de los niveles de P_4 , que dan lugar a una mayor liberación de LH; necesaria para el desarrollo, maduración y ovulación del folículo ovulatorio. Por el contrario, si no se produce la luteolisis, los altos niveles de P_4 mantienen en niveles basales (pulsos de baja frecuencia) las concentraciones de LH; en consecuencia, el crecimiento del folículo seleccionado se desacelera, sufriendo un proceso de atresia que conduce a la aparición de una fase de reclutamiento folicular y una nueva onda de desarrollo folicular (Lopez-Sebastian et al., 1997; Adams, 1999).

3.2. Inducción y Sincronización del Celo de la Oveja

El control del ciclo sexual, concretamente la inducción y sincronización del celo, se ha llevado a cabo en ovinos mediante el empleo tanto de métodos farmacológicos como naturales. Entre los primeros destacan el uso de la P_4 y sus análogos, administrados principalmente en forma de dispositivos intravaginales, y el uso de prostanoides, o análogos de la $PGF_{2\alpha}$, administrados por vía parenteral. Entre los métodos naturales, destaca el uso de la bioestimulación ejercida por la presencia del morueco más conocido como “efecto macho”.

3.2.1. Métodos Farmacológicos

A. Progestágenos: la P_4 y sus análogos sintéticos (progestágenos) son hormonas empleadas para controlar el ciclo sexual de las ovejas, simulando la presencia de un CL funcional e induciendo la ovulación tras su retirada (Robinson, 1965). Usualmente, se emplean en combinación con gonadotropina coriónica equina (eCG, antes llamada PMSG). Su principal ventaja es la inducción y sincronización del celo tanto en la época reproductiva como en época de anestro estacional; con ello se posibilita, la productividad de esta especie en las diferentes épocas del año.

Generalmente, la progesterona o los progestágenos se administran por medio de dispositivos y/o esponjas intravaginales, que se mantienen durante un periodo similar a la duración de la fase luteal (12 a 14 días), para superar la vida media de un posible cuerpo lúteo existente en el ovario. Durante su inserción se reduce la pulsatilidad de la liberación de LH, así como la descarga preovulatoria que induce la ovulación; en el momento de retirada del dispositivo se libera el bloqueo de la LH, produciéndose el crecimiento folicular y el celo acompañado de ovulación (Dutt y Casida, 1948; Robinson, 1965). En general, los progestágenos inducen un incremento del crecimiento folicular y la secreción de E_2 - 17β a las 24 horas de haberse retirado el progestágeno; produciéndose la aparición de celos sincronizados entre las 32 y 36 horas (López Sebastián, 1991).

Entre los compuestos disponibles en el mercado, y comúnmente empleados en pequeños rumiantes, destacan la P_4 (utilizada habitualmente en dosis de 300 mg), el acetato de fluorogestona (FGA; dosis entre 20 y 40 mg) y el acetato de medroxiprogesterona (MAP; dosis de 60 mg). Todos ellos son aplicados intravaginalmente, ya sea en forma de un dispositivo de liberación o CIDR (P_4) o en forma de esponjas de poliuretano (MAP y FGA).

En el momento de la retirada, y con la finalidad de mejorar la maduración folicular y la tasa ovulatoria del tratamiento, se combinan con la administración de eCG en dosis que varían de 350 a 600 U.I., según raza, peso del animal y época del año (Roberts y Hafez, 1969; Langford, et al., 1983; Greyling et al., 1997; Leyva et al., 1998).

La efectividad de los tratamientos progestativos, depende tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. Entre los factores intrínsecos que modulan la respuesta inducida por los tratamientos progestativos, se mencionan el genético o racial, la edad de la hembra y el estado nutricional. Todos ellos, ya sea de forma aislada o en conjunto, establecen o definen el estatus ovárico en el momento de aplicar los protocolos de sincronización y, en consecuencia, la respuesta a estos.

Los estudios llevados a cabo para evaluar el efecto de la edad sobre la eficiencia de los tratamientos progestativos han demostrado una ausencia de efectos sobre la tasa de celos y de fertilidad; por el contrario, sí se ha encontrado influencia sobre el número de corderos nacidos, siendo mayor en la ovejas adultas que en corderas (2,7 vs 1,9 corderos/oveja; Ainsworth y Wolynetz, 1982). Asimismo, la prolificidad atribuida al componente genético, afecta la eficiencia de los tratamiento progestativos (Kareta et al., 2006).

Igualmente, ovejas con un adecuado estatus nutricional, presentan una foliculogénesis más adecuada y una mayor tasa de ovulación (Scaramuzzi et al., 2006). En consecuencia, los tratamientos de sincronización de celos y/o de superovulación mejoran su eficacia en comparación con aquellas ovejas con una baja condición nutricional (Viñoles et al., 2005; Scaramuzzi et al., 2006).

Entre los factores extrínsecos que afectan la efectividad de los tratamientos progestativos destacan el tipo de principio activo, la época de aplicación del tratamiento, la dosis empleada y la duración o tipo de protocolo empleado.

En relación al principio activo, la respuesta a la aplicación de los diferentes compuestos progestativos, en porcentaje total de aparición de celos, tasa de ovulación y fertilidad, es similar. Así, Rhodes y Nathanielsz (1988), no hallaron diferencias en los porcentajes de celos totales (88,9 y 87,6%) y de gestación (56,6 y 57,7%), en ovejas tratadas con MAP y CIDR, respectivamente; lo mismo ocurre en estudios comparativos de FGA y MAP (Steffan et al., 1982; Lopez-Sebastian et al., 1991). Sin embargo, sí se encontraron diferencias en el momento de inicio del celo (en relación a la retirada del tratamiento) y la sincronización o agrupamiento de los celos, en ovejas tratadas con diferentes principios activos, con o sin eCG. Así, hembras tratadas con progesterona o CIDR, presentan celos más tempranos y mejor sincronizados (agrupados) que en el caso de las tratadas con MAP (80 y 40,9%, en las primeras 24 horas después del tratamiento,

respectivamente; Rhodes y Nathanielsz, 1988). Igualmente, este comportamiento fue descrito por Walker et al. (1989); estos autores, comparando progesterona, FGA y MAP en protocolos tradicionales de 12 días combinados con eCG, observaron que las ovulaciones aparecieron más temprano en las ovejas tratadas con CIDR.

En cuanto a la dosis, existe evidencia que dosis inferiores a las comerciales pueden ser tan efectivas como aquellas recomendadas por los laboratorios. Esto es confirmado por el hecho de que se han detectado residuos de MAP en esponjas usadas en ovejas por 14 días (Simonetti et al., 2000). En este sentido, estos autores demostraron que esponjas con dosis tan bajas como 40 mg de MAP fueron tan efectivas como la dosis comercial (60 mg), en términos de porcentaje de celos (79 vs 81%), momento de aparición del celo (56 vs 58 horas) y tasa de preñez (44 vs 46%; usando inseminación cervical con semen fresco).

Asimismo, el acortamiento de los tratamientos o el uso de protocolos ultracortos de 6 días durante la época de anestro (usando 30 mg de MAP + eCG; Ungerfeld y Rubianes, 2002), han demostrado ser tan efectivos como aquellos tradicionales de 14 días, en términos de porcentaje de celos (86 vs 100%), inicio del celo (46 vs 44 hrs) y tasa de concepción (44 vs 44,4%; Ungerfeld y Rubianes, 2002). Igualmente, cuando estos autores evaluaron la efectividad del MAP, FGA y progesterona en combinación con eCG, en este tipo de protocolos, no hallaron diferencias en términos de porcentaje de celos (94, 92 y 96%), inicio del celo (45, 39 y 40 horas) y tasa de concepción (usando monta natural; 63, 67 y 60%). Asimismo, el uso de estos protocolos durante la época reproductiva (usando 60 mg de MAP con o sin eCG; Viñoles et al., 1999) ha demostrado una eficiencia similar al tratamiento largo, en términos de porcentaje de aparición de celos; no obstante, el inicio del celo fue mayor para los tratamientos cortos (85 y 73 horas; con o sin eCG) que en los largos o convencionales (45 y 49 horas; con o sin eCG).

La época del año no presenta efectos significativos sobre los tratamientos progestativos combinados con eCG. Así, Langford, et al. (1983), señalan ausencia de diferencias en ovejas inseminadas, tanto en la época de anestro como en la reproductiva, en la tasa de concepción (82 y 87% respectivamente) y en el porcentaje de partos (60 y 74% respectivamente).

Independientemente del tipo de inseminación (monta natural o inseminación artificial), los rendimientos obtenidos con el uso de los progestágenos se encuentran limitados por un menor porcentaje de fertilidad, en comparación a la obtenida con celos espontáneos (Lunstra y Christenson, 1981; Donovan et al., 2004). Esto puede relacionarse con limitaciones propias del sistema de inseminación a tiempo fijo (57 horas), que no toma en cuenta aquellos celos/ovulaciones que están fuera del rango de sincronización; existiendo, en consecuencia, un pequeño porcentaje de hembras que no

llegan a ser fecundadas. Asimismo, otras posibles causas que pueden contribuir a este bajo rendimiento, son alteraciones en: a) el crecimiento folicular preovulatorio y su secreción de estradiol (Gonzalez-Bulnes et al., 2005); b) los patrones de liberación de LH (Gordon, 1975; Scaramuzzi et al., 1988); c) la calidad de las ovulaciones (Killian et al., 1985); d) la secreción de progesterona (Gonzalez-Bulnes et al., 2005) y e) el transporte de espermatozoides y la supervivencia de estos en el tracto genital femenino (Hawk y Conley, 1971). Además, el uso de progestágenos presenta como inconvenientes la aparición de residuos químicos en el organismo -que, por otro lado, se encuentra limitada por la legislación de diferentes países-, la inducción de infecciones (principalmente vaginitis) en los animales tratados y el alto costo del tratamiento y su escasa disponibilidad en la mayor parte los países subdesarrollados.

B. Prostanoides: la prostaglandina $F_{2\alpha}$ es el factor luteolítico en rumiantes; por ello, esta hormona o sus análogos sintéticos (agentes luteolíticos con mayor potencia que la propia $PGF_{2\alpha}$ natural) son utilizados para la inducción y sincronización de celos y ovulaciones (Weems et al., 1999).

La aplicación de estos tratamientos induce la lisis del CL y, en consecuencia, la aparición de una fase folicular acompañado de celo y ovulación (Chamley et al., 1972; Acryptopoulou et al., 1977). Su principal ventaja está en no dejar residuos en el animal, ya que la $PGF_{2\alpha}$ es totalmente metabolizada en el pulmón (99%), en componentes prácticamente inactivos (Light et al., 1994).

En la oveja, se ha demostrado que la acción luteolítica inducida por un análogo de $PGF_{2\alpha}$ administrado durante la fase luteal del ciclo no muestra diferencias con la producida espontáneamente en un ciclo estral, ni en los patrones de variación de los niveles plasmáticos de P_4 , ni en la cantidad ni la duración del pico preovulatorio de LH ni en el desarrollo folicular, consecutivos a la luteolisis (Acryptopoulou et al., 1977; Driancourt y Cahill, 1984).

La respuesta obtenida tras la administración de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ es muy dependiente del momento del ciclo en que este se administre. Así, Acryptopoulou y Haresign (1980) demostraron una alta efectividad luteolítica en la administración de 100 μ g de cloprostenol entre los días 5 y 14 del ciclo; produciéndose una rápida caída de las concentraciones plasmáticas de P_4 por debajo de 0,5 ng/mL durante las 24 horas posteriores a la inyección y una alta sincronización de celos y pico preovulatorio de LH ($37,7 \pm 1,6$ y $45,3 \pm 3,2$ horas, respectivamente).

Por el contrario, la inducción de luteolisis es menor o nula en fase luteal temprana (día 3) y tardía (día 16 del ciclo). Esto ha conducido a que, en los protocolos de sincronización del celo, se apliquen dos inyecciones con 10 u 11 días de separación;

con la finalidad de que todos los animales tratados tengan un CL superior a los 5 días de edad.

En este sentido, el uso de una inyección de un análogo de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, en un rebaño de hembras cíclicas permite obtener entre 60 y 70% de presentación de celos, entre las 30 y 48 horas posteriores al tratamiento. Esta proporción obedece a que no todas las ovejas presentan un CL activamente maduro; debido a que una proporción de los animales tienen un CL en regresión, formación o están en estro. Contrariamente, el uso de dos inyecciones, con 9 a 11 días de separación, permite que todas las hembras tengan un CL activo en el momento de aplicar la segunda administración; garantizando de esta forma un alto porcentaje de celos sincronizados (> 80%; Gonzalez-Bulnes et al, 2005; Keisler, 2007). La tasa de concepción obtenida en estos tratamientos llega a alcanzar el 86% (en comparación con el 76% en ovejas no tratadas) cuando se usan dos inyecciones con 10 días de separación (Godfrey et al., 1997a, b). Por el contrario, con este protocolo, Álvarez et al. (1994) y Hernández et al. (2001) describen entre un 43% y un 36% de sincronización del celo en ovejas Pelibuey tratadas con dos administraciones de dinoprost (15 mg) con 8 días de separación; estos bajos resultados pueden ser debidos, probablemente, a fallos en la luteolisis inducida por el tratamiento. No obstante, Rubianes et al. (2003) obtienen luteolisis efectiva, con un 100% de celos y ovulación, tras la aplicación de delprostenato (160 μg) a partir del tercer día después de la ovulación.

La eficacia de los tratamientos con análogos de la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ depende igualmente de factores extrínsecos e intrínsecos, la respuesta obtenida presenta resultados similares, en cuanto a porcentaje de celo y fertilidad (Acryptopoulou y Haresign, 1980; Godfrey et al., 1997a; Gonzalez-Añover et al., 2007).

Otro factor extrínseco a destacar es el relacionado con la dosis utilizada. En este sentido, Torres et al. (1996) compararon, en cabras, la eficiencia de dos dosis de dinoprost (2,5 y 5 mg), en dos administraciones con 7 días de separación; los resultados muestran un 64 y 78% de celos y un 100 y 86% de preñez para las dosis alta y baja, respectivamente.

En cuanto a los factores intrínsecos, estos tienen los mismos efectos que los mencionados anteriormente para los progestágenos, debido a que estos definen el estatus ovárico al momento de aplicar los tratamientos; modulando en consecuencia, la respuesta.

3.2.2. Métodos Naturales (“Efecto macho”)

El “efecto macho” consiste en la inducción del celo y la ovulación en un grupo de hembras en anestro cuando son expuestas a la presencia del morueco, tras un período previo de aislamiento (superior a las tres semanas). Este contacto hace que las hembras en anestro reciban tanto señales olfativas (feromonas) como no olfativas (contacto visual, físico o sonoro); siendo estas últimas complementarias y, en algunos casos, sustitutivas de las feromonas (Underwood et al., 1944; Martin et al., 1986; Pearce y Oldham, 1984; 1988).

Las señales químicas o feromonas emitidas por el morueco provienen principalmente de ácidos grasos secretados en las glándulas sebáceas de la piel y aislados de extractos de lana (Knight y Lynch, 1980; Signoret et al., 1982). Las feromonas emitidas por el macho cabrío están mejor identificadas, estando compuestas por ácidos grasos de 8, 10 y 12 átomos de carbonos y producidas en las glándulas sebáceas de la piel (Sugiyama et al., 1981; Knight et al., 1983; Martin et al., 1986). Estas son captadas por vía olfatoria, a través de la mucosa nasal y del órgano vomeronasal, transmitiéndose la señal hacia los bulbos olfatorios principal y accesorio, respectivamente (Gelez y Fabre-Nys, 2004). Dichas estructuras mantienen relación con el sistema neuroendocrino, traduciéndose finalmente en un aumento de la frecuencia de pulsos de LH hasta inducir la descarga preovulatoria de LH y la ovulación, entre las 30 y 72 horas posteriores al contacto. En las ovejas en anestro, la primera ovulación tras la introducción del macho no viene acompañada de celo. El 50% de los cuerpos lúteos derivados de esta primera ovulación tienen una función y duración normales, dando lugar a un ciclo de duración normal, produciéndose una segunda ovulación acompañada de celo fértil entre los 18 y 19 días tras la introducción del macho. No obstante, en el resto de las ovejas, el CL resultante de esa primera ovulación posee una menor duración (7 días) y función anormal, dando lugar a una segunda ovulación; en ocasiones también sin signos de celo y acompañada por una tercera ovulación con celo fértil que aparece alrededor del día 25 después de la introducción de los machos (Corke, 1980; Cognie et al., 1982; Knight, 1983; Pearce y Oldham, 1984; Martin et al., 1986).

Entre los factores que pueden condicionar la respuesta al efecto macho, destacan: el nivel o grado de aislamiento previo al contacto, dado por la distancia de separación y la calidad o grado de contacto durante la misma; el nivel de contacto (posterior a la separación), entre ambos grupos sexuales, ya que el contacto físico directo permite un grado mayor de estimulación al logrado con el contacto olfatorio, auditivo o visual (Pearce y Oldham, 1988); el grado de actividad sexual de los machos y la condición corporal de los grupos sexuales que también afecta positivamente la respuesta al estímulo (Perkins y Fitzgerald, 1994; Yildis y col., 2003). Igualmente, el grado o profundidad del anestro es otro factor que afecta negativamente a la

efectividad de la respuesta, ya que hembras en anestro profundo presentan su primera ovulación más tarde que aquellas con anestro superficial (Martin et al., 1986; Chemineau, 1987). Finalmente, la edad de los grupos sexuales puede afectar positivamente la respuesta al efecto macho, ya que animales jóvenes son sexualmente menos activos que los adultos (Murtagh et al., 1984).

La principal ventaja del efecto macho en los pequeños rumiantes radica en que es una herramienta sencilla y económica para incrementar o intensificar la actividad reproductiva y productiva de la hembra, a un bajo costo. De esta forma, el efecto macho puede ser usado para adelantar el inicio de la pubertad (Lopez Sebastián et al., 1985; Kassem et al., 1989; Al-Maully et al., 1991) o adelantar el reinicio de la actividad ovárica postparto (Godfrey et al., 1998; Contreras et al., 2003). En este último caso, hay que tener en cuenta que para obtener una eficiente respuesta a la bioestimulación durante este período, ésta debe llevarse a cabo varios días después del parto (en un mínimo de 7 días; Godfrey et al., 1998), ya que en las etapas muy próximas al parto existen bajos niveles de LH en la adenohipófisis (Yavas y Walton 2000).

Por otra parte, una forma de mejorar la respuesta al efecto macho es a través de la disminución o supresión de la alta incidencia de ovulaciones silentes y ciclos cortos (caracterizados por la presencia de cuerpos lúteos de corta duración). Esto se puede conseguir tratando a las ovejas con una dosis (usualmente 20 mg por vía intramuscular en vehículo oleoso) de progesterona 24 horas antes o en el momento de introducción de los machos (Cognie et al., 1982). González-Bulnes et al. (2006), observaron una mayor agrupación de celos (100%), durante los cuatro primeros días después de la introducción de los machos, en cabras sometidas a efecto macho y tratadas con 25 mg i.m. de progesterona, respecto aquellas sometidas únicamente a efecto macho (20% de celos). Este comportamiento, probablemente, se deba a que la progesterona actúe retardando el pico de LH y facilitando y prolongando la exposición de los folículos en desarrollo al efecto de las gonadotropinas. Esto podría facilitar un mejor desarrollo folicular, asegurando de esta forma los procesos de maduración previos al momento de la ovulación (González-Bulnes et al., 2006; Rosa y Bryant, 2002).

En los últimos años, se ha combinado el uso del efecto macho con otros tratamientos hormonales para sincronización del celo (utilizando el aumento en el patrón de secreción de la LH que produce el efecto macho); esta combinación constituye una alternativa eficaz para reducir costos y mejorar la eficiencia de programas de inseminación artificial (Lucidi et al., 2000; Ungerfeld et al., 2003; Kenji et al., 2004; Hawken et al., 2005).

4. PLAN EXPERIMENTAL

Los experimentos fueron realizados sobre un total de 197 animales de raza West African, alojados bien en las instalaciones del Instituto de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, bien en las instalaciones del Campo Experimental del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Ambos centros se encuentran ubicados en Maracay (10° N), Estado Aragua, Venezuela.

Todas las hembras eran adultas (1,5-5,5 años), no lactantes, con una adecuada condición corporal durante la realización de los ensayos, y se mantuvieron alojadas en corrales de 70 m², provistos con 30% de sombra. La alimentación consistía en una ración (250 g/animal/día; 17% PC) de concentrado comercial y heno de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) *ad libitum*

Previamente a cada ensayo, las ovejas fueron evaluadas por ecografía transrectal para descartar alteraciones del tracto genital y determinar una correcta funcionalidad ovárica, mediante la valoración de la presencia de folículos antrales y cuerpos lúteos en los ovarios (Contreras-Solís et al., 2007a,b; ver anexos I y V).

4.1. Objetivo 1. Determinación de las características del ciclo ovárico y el momento más adecuado para la lisis temprana del cuerpo lúteo mediante la administración de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$

Los objetivos de este experimento fueron, en primer lugar, evaluar la dinámica de crecimiento folicular durante el ciclo sexual en ovejas de raza West African, en base a la observación del desarrollo individual de los folículos de mayor tamaño y a su efecto sobre el resto de la población folicular. En segundo lugar, establecer posibles variaciones en dicha dinámica folicular según las diferentes fases del ciclo sexual y la presencia del cuerpo lúteo, tanto a nivel sistémico como intraovárico. Este experimento fue realizado, durante los meses de septiembre y octubre de 2004, sobre un lote de 12 ovejas (entre 1,5 y 2 años de edad) con un peso promedio (media \pm EE) de $30,5 \pm 0,6$ kg al inicio del ensayo.

Con el objeto de sincronizar el momento de la aparición del celo y ovulación, a todos los animales les fueron administradas dos inyecciones (10 mg, i.m.) de un análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (dinoprost, Lutalyse®, Pharmacia-Upjhon, Valencia, Venezuela) con 10 días de separación. La finalidad de la tercera dosis fue sincronizar al máximo la aparición y desarrollo de la fase folicular en todos los animales, mediante la lisis de cuerpos lúteos de la misma edad. Seguidamente, se procedió a la detección de la aparición de la sintomatología del celo y, a partir de este momento, se hizo la evaluación ecográfica de las estructuras ováricas (folículos y cuerpos lúteos) cada 24 horas, durante uno o dos ciclos sexuales, según la metodología descrita en el anexo I. Coincidiendo con cada observación ecográfica, se tomaron muestras de sangre a cada animal, con la finalidad de valorar las concentraciones plasmáticas de P_4 como indicador de la funcionalidad de los cuerpos lúteos. Cabe destacar que, debido a la variabilidad fisiológica que aparece en la duración de los ciclos, en el presente estudio, estos fueron previamente divididos en dos períodos: inicio (día 1 al 12) y días final (día -4 al -1), para así normalizar su duración.

4.1.1. Resultados

4.1.1.a. Características del desarrollo del folículo y del cuerpo lúteo durante el ciclo estral

La duración media de los ciclos interovulatorios estudiados fue de $16,8 \pm 0,2$ días. De los 15 ciclos estudiados, diez (66,7%) tuvieron 3 ondas de desarrollo folicular, dos (13,3%) presentaron 2 ondas y 3 (20%) tuvieron 4 ondas foliculares (ver anexo I). La duración de los ciclos con 2, 3 y 4 ondas fue de $16,5 \pm 0,5$; $16,9 \pm 0,2$ y $16,7 \pm 0,4$ días, respectivamente. El número promedio de folículos en desarrollo detectados en cada ciclo fue de $89,3 \pm 6,9$ (de 58 a 144); de ellos, el número de folículos pequeños (2-3 mm), medianos (4 mm) y grandes (≥ 5 mm) fue de $77,1 \pm 5,6$; $7,6 \pm 0,6$ y $4,6 \pm 0,6$ folículos, respectivamente.

El CL creció en el inicio del ciclo, desde un tamaño (área) medio de $32,0 \pm 3,1$ mm² en el día 1 después de la ovulación hasta alcanzar un tamaño de $85,1 \pm 5,0$ mm² en el día 7 del ciclo ($P < 0,0001$). Entre los días 7 y 11 mantuvo un tamaño promedio de $78,1 \pm 3,1$ mm² (Figura 1), para iniciar, finalmente, su regresión. En cuanto a los niveles de P₄ en plasma, estos aumentaron desde el día 1 hasta el 11 ($P < 0,0001$) del ciclo, evidenciándose la presencia, del CL funcional (con valores de P₄ $\geq 0,5$ ng/ml), entre los días 3 y -2 del ciclo estral. Asimismo, hubo una correlación significativa ($P < 0,001$) entre los niveles plasmáticos de P₄ y las dimensiones del tejido luteal, en términos de diámetro ($r = 0,599$) y área de los CLs ($r = 0,565$).

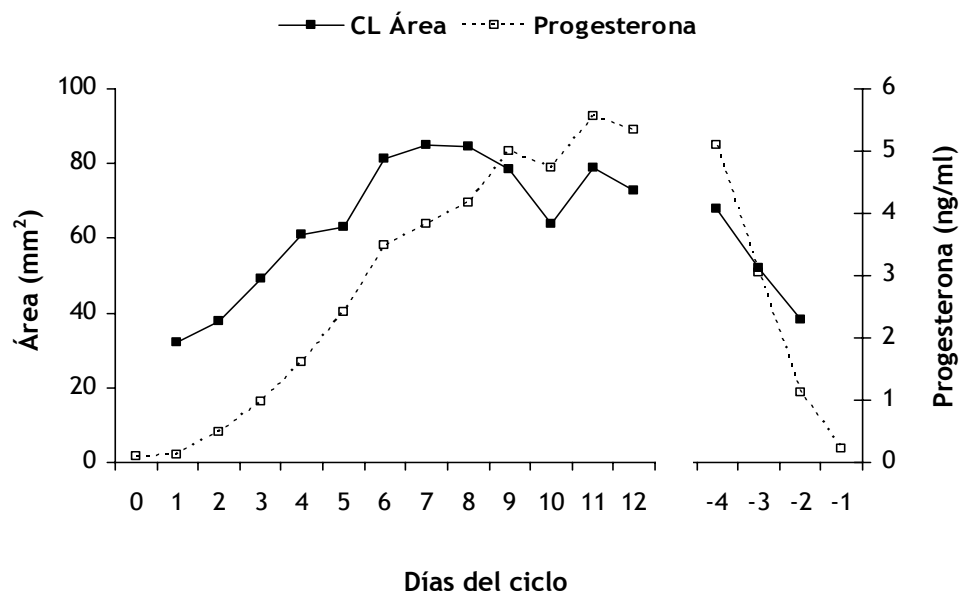


Figura 1. Concentraciones de progesterona en plasma (ng/ml) y área del cuerpo lúteo (mm²) durante el ciclo el ciclo estral en ovejas West African.

4.1.1.b. *Interacción entre la dinámica folicular y la fase del ciclo estral (efectos sistémicos del folículo dominante y del cuerpo lúteo)*

Los análisis llevados a cabo para estudiar los efectos de las diferentes fases del ciclo estral sobre el desarrollo folicular fueron restringidos a aquellos ciclos con 3 ondas foliculares, con el fin de normalizar las observaciones. Estos ciclos se caracterizaron por desarrollarse la primera y segunda onda durante las fases luteales temprana e intermedia, respectivamente; y la tercera onda durante la fase luteal tardía y/o folicular temprana. El desarrollo folicular en cada una de las ondas y sus diferencias en cada una de ellas, están descritos en la Tabla 1. En este estudio se observó que la duración de la segunda onda fue más corta que la primera ($P < 0,05$), sin observarse diferencias entre la primera y tercera onda y entre la segunda y tercera onda.

Tabla 1. Día de inicio, duración y tamaño del folículo de mayor diámetro (Media \pm EE) durante la etapa inicial (Onda 1) intermedia (Onda 2) y tardía (Onda 3) de la fase luteal del ciclo estral en ovejas de pelo.

	Onda 1	Onda 2	Onda 3
Inicio de la onda (día del ciclo)	1,1 \pm 0,3 ^a	6,3 \pm 0,4 ^b	10,7 \pm 0,5 ^c
Día de máximo diámetro (día del ciclo)	4,3 \pm 0,3 ^a	8,6 \pm 0,5 ^b	16,0 \pm 0,2 ^c
Duración (días)	4,1 \pm 0,2 ^a	3,4 \pm 0,3 ^a	6,3 \pm 0,4 ^b
Diámetro del folículo al inicio de la onda (mm)	2,3 \pm 0,1	2,6 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1
Máximo diámetro del folículo (mm)	5,0 \pm 0,2 ^a	3,9 \pm 0,1 ^b	5,7 \pm 0,2 ^c
Día del final de la onda (día del ciclo)	7,1 \pm 0,3 ^a	10,9 \pm 0,6 ^b	-
Diámetro del folículo al final de la onda (mm)	2,7 \pm 0,3	2,4 \pm 0,1	-
Número de días de la regresión	2,8 \pm 0,4	2,3 \pm 0,3	-
Duración de la onda	6,9 \pm 0,3 ^d	5,7 \pm 0,4 ^e	6,3 \pm 0,4 ^{de}

a \neq b \neq c: $P < 0,0001$; d \neq e: $P < 0,05$.

Igualmente, la duración de la fase de crecimiento del folículo dominante, tendió ($P = 0,06$) a ser más corta en la segunda onda que en la primera; no obstante, la duración de la fase de crecimiento en las primeras dos ondas fue ser más corta que en

a la tercera onda ($P < 0,0001$). En relación al folículo dominante de la segunda onda, este fue de menor tamaño ($P < 0,0001$) y con una tasa de crecimiento menor ($0,4 \pm 0,1$ mm/día; $P < 0,01$) que aquellos correspondientes a la primera y tercera onda ($0,7 \pm 0,1$ y $0,6 \pm 0,1$ mm/día; respectivamente).

Con relación a la población folicular, en el momento en que el folículo dominante alcanza su mayor diámetro, el número de folículos pequeños fue menor ($P < 0,01$), en la onda uno y tres, en comparación con la segunda onda ($3,4 \pm 0,8$ y $2,3 \pm 0,7$ comparado con $6,3 \pm 1,0$ folículos; Figura 2). El número promedio de folículos pequeños disminuyó a través del período de crecimiento del folículo dominante, durante la tercera onda de desarrollo folicular (de $5,2 \pm 0,7$ a $2,3 \pm 0,7$ folículos; $P < 0,05$); sin embargo, esta relación no fue observada en la primera (de $4,1 \pm 0,8$ a $3,4 \pm 0,7$ folículos) y segunda onda (de $6,3 \pm 0,9$ a $6,3 \pm 1,0$ folículos; Figura 2).

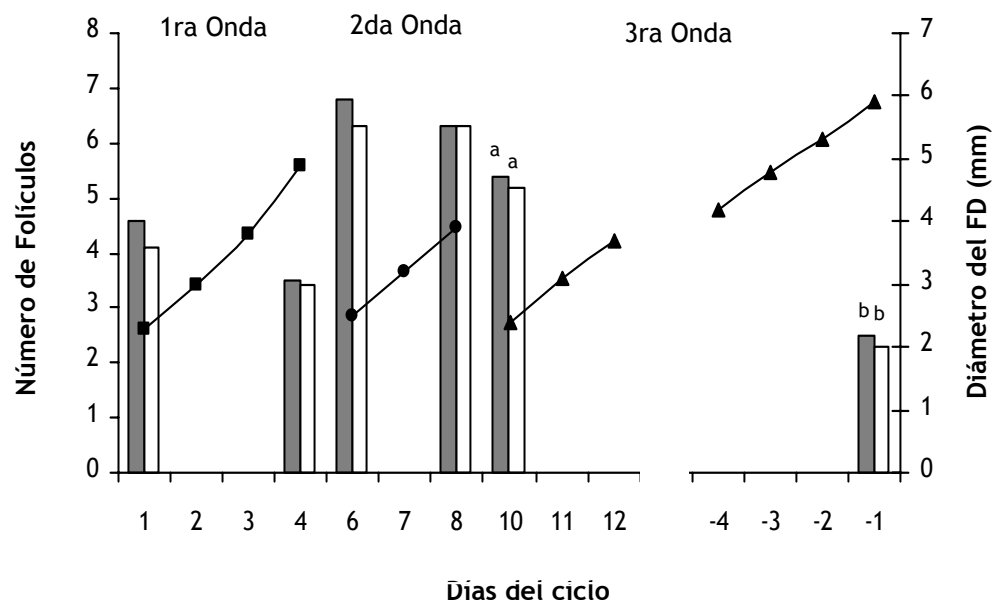


Figura 2. Numero total de folículos (Barras grises; ≥ 2 mm) y número de folículos pequeños (barras blancas; 2-3 mm) al inicio y al final de la fase de crecimiento del folículo dominante en ovejas con tres ondas de desarrollo folicular.

4.1.1.c. Efectos intraováricos del cuerpo lúteo

Los análisis para determinar la población folicular en aquellos ovarios que presentaron CL o no lo presentaron, entre los días 3 y -2 del ciclo (período en que hubo un CL funcional), no mostraron diferencias en el número total de folículos pequeños y medianos; no obstante, el número de folículos grandes/ciclo fue menor en aquellos ovarios con CL ($P < 0,01$; Tabla 2). Por otro lado, el análisis del número de folículos/ovario/día durante el mismo período, mostró una disminución en el número de folículos totales ($P < 0,01$) y grandes ($P < 0,001$) en aquellos ovarios que presentaron CL.

Tabla 2. Efecto de la presencia o ausencia del CL sobre el número de folículos/ovario/ciclo y de folículos/ovario/día (Media \pm EE), entre los días 3 y -2 del ciclo.

Número de Folículos por Ciclo			
Categoría	Ovarios con CL	Ovarios sin CL	Ambos ovarios
Folículos 2-3 mm	28,9 \pm 2,3	36,1 \pm 4,6	64,3 \pm 5,2
Folículos 4 mm	3,1 \pm 0,6	3,4 \pm 0,5	6,4 \pm 0,7
Folículos 5 mm	0,9 \pm 0,5 ^a	2,7 \pm 0,3 ^b	3,6 \pm 0,5
Total de folículos (\geq 2mm)	32,4 \pm 2,4 ^e	42,2 \pm 4,9 ^f	74,4 \pm 5,1
Número de folículos por día del ciclo			
	Ovarios con CL	Ovarios sin CL	Ambos ovarios
Folículos 2-3mm	2,2 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	5,0 \pm 0,2
Folículos 4mm	0,2 \pm 0,04	0,3 \pm 0,04	0,5 \pm 0,04
Folículos 5 mm	0,1 \pm 0,02 ^c	0,2 \pm 0,02 ^d	0,3 \pm 0,03
Total de folículos (\geq 2mm)	2,5 \pm 0,1 ^a	3,3 \pm 0,1 ^b	5,8 \pm 0,2

a \neq b: $P < 0,01$; c \neq d: $P < 0,001$; e \neq f: $P = 0,08$.

4.1.2. Discusión

Los patrones de desarrollo folicular durante el ciclo estral en ovejas de pelo, coinciden con aquellos descritos en ovejas de lana (Bartlewsky et al., 1999a, Evans et al, 2000). La dinámica folicular se caracteriza por el desarrollo de 2 a 4 ondas de desarrollo folicular; siendo los ciclos de 3 ondas los más comunes. Los folículos de tamaño ovulatorio presentes en cada onda son capaces de ejercer su dominancia sobre los folículos subordinados, pero tal efecto es modulado por la etapa o fase del ciclo estral (esto es, por la presencia o ausencia de un CL totalmente activo). En este sentido, estos datos evidencian que el CL afecta tanto la dinámica folicular en ambos ovarios (efecto sistémico) como en su ovario ipsilateral (efecto local).

El presente estudio demuestra un efecto de dominancia por parte del folículo más grande en cada onda, de forma similar a lo descrito previamente en ovejas de lana (Bartlewsky et al., 1999a; Evans et al., 2000). En resumen, la presencia del folículo dominante ejerce una efecto inhibitor en la emergencia de nuevos folículos, siendo el número de folículos ≥ 2 mm similar a aquellos descritos en ovejas monovulares de la raza Merina (Lopez-Sebastian et al., 1997); asimismo, el crecimiento de estos folículos se ve inhibido por este efecto de dominancia (Gonzalez-Bulnes et al., 2001, 2004). Además, los datos obtenidos confirman la hipótesis de Adams (1999), sobre la existencia de una onda folicular mayor -caracterizada por la presencia, durante las fases luteal temprana y folicular, de un folículo que alcanza el estado de dominancia- y una onda folicular menor durante la fase luteal media -que se caracteriza por la presencia de un folículo con un menor efecto de dominancia. Esta ausencia de dominancia, durante la fase luteal del ciclo estral en la oveja, se ha hipotetizado que puede ser debida al efecto supresor del CL (Adams, 1999).

En relación a la imagen ecográfica y el tamaño del CL, estos variaron desde el momento de la ovulación hasta la luteolisis; siendo también similar a lo descrito, previamente, en otras razas ovinas (Bartlewski et al., 1999b; Gonzalez-Bulnes et al., 2000). En este sentido, el área del CL estuvo correlacionada con el día del ciclo y los niveles de P_4 en plasma. Sin embargo, los diámetros del CL obtenidos en el presente estudio, como ocurría con el folículo dominante, fueron menores que aquellos descritos en ovejas de lana (Ravindra et al., 1994). Este hecho puede estar relacionado con el pequeño tamaño corporal de la raza West African, ya que similares diferencias han sido encontradas cuando se comparan razas europeas pesadas y livianas (Gonzalez-Añoover et al., 2006). En todo caso, las similitudes en la dinámica de crecimiento de los folículos y del CL con otras razas de diferentes orígenes y manejadas bajo diferentes condiciones, a pesar de las diferencias encontradas en el tamaño de las estructuras ováricas, refuerzan la hipótesis que la raza, las condiciones ambientales o la selección pueden influenciar la actividad reproductiva estacional, pero no afectan la actividad propia del ovario durante el ciclo estral. Resultados similares han sido descritos cuando se han

comparado ovejas domésticas con silvestres (Gonzalez-Bulnes et al. 2001) o cuando se comparan diferentes razas de cabras domésticas (Cueto et al. 2006).

Estudios previos llevados a cabo con otras razas ovinas han demostrado la interacción entre el desarrollo del CL y de los folículos (Dufour et al., 1972; Rexroad y Casida, 1977). En el presente estudio, la duración de la segunda onda, durante la fase luteal intermedia, fue más corta; así como también la fase de crecimiento del folículo dominante. Además, el crecimiento de los folículos subordinados fue solamente inhibido por el folículo dominante y preovulatorio de la primera y tercera onda respectivamente. Estas observaciones indican la ausencia del efecto de dominancia durante la presencia de un CL activo, dando nuevas evidencias que soportan la hipótesis de Adams (1999), acerca de la existencia del efecto supresor de la progesterona, sobre la vida media de los folículos dominantes. Es bien conocido que la progesterona actúa sobre el desarrollo del folículo por vía sistémica, por medio de la disminución de la frecuencia de pulsos de LH; pulsatilidad que es esencial para el desarrollo de los grandes folículos y el establecimiento del proceso de selección y dominancia. Contrariamente, la FSH no juega un papel definido durante esta fase, debido al efecto inhibitorio del estradiol y la inhibina producidos por el folículo dominante (Campbell et al., 1999; Webb et al., 1999).

No obstante, la mayoría de los hallazgos encontrados en el presente estudio no sólo demuestran la presencia de un efecto sistémico, sino también de un posible efecto intraovárico o local del CL sobre la dinámica folicular. Esta situación provocaría una marcada disminución en el número de folículos en crecimiento en aquellos ovarios que presentan CL (Bartewsky et al., 2001). Estos resultados, descritos también en otras especies (vaca: Thatcher, et al., 1991), coinciden con hallazgos clínicos en humanos, en los cuales, los folículos dominantes que aparecen en el ovario contralateral al que presentó la ovulación anterior son de mejor calidad que aquellos que provienen del ovario ipsilateral; lo que se traduce en un aumento de la calidad de los embriones producidos por FIV (Fukuda et al., 1996). Una posible explicación de este efecto puede atribuirse a la secreción de ciertos factores inhibidores liberados por el CL, tales como la inhibina. Esta hormona es secretada por el CL de la cabra y la vaca (Sangha et al., 2002) y se ha encontrado en altas concentraciones en la vena ovárica de ovarios con CL en la oveja (Tsonis et al., 1988). No obstante, los resultados obtenidos en estudios sobre la función de este péptido no son aún concluyentes; Rodger (1989), señala la ausencia de ARNm para las subunidades α y β de inhibina en las células luteales de la oveja. Por ello, se hace necesario llevar a cabo estudios adicionales con diseños experimentales específicos para determinar la existencia de dichos factores y de sus mecanismos de acción. En todo caso, los resultados del presente estudio evidencian la existencia de efectos inhibidores, tanto sistémicos como locales, del CL sobre las fases finales de crecimiento de los folículos dominantes y preovulatorios; efectos que

comprometerían la función folicular, principalmente durante la fase luteal intermedia. Estudios previos llevados a cabo en ovejas de lana han evidenciado que la ovulación de tales folículos está asociada a una baja fertilidad (Johnson et al., 1996; Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles et al., 1999). Esto hace pensar en la posibilidad de usar, en ovejas de pelo, un protocolo de sincronización del celo utilizando análogos de $\text{PGF}_{2\alpha}$, para inducir la luteolisis, durante las fases luteales temprana o tardía. Los datos obtenidos en ovejas de lana indican un gran porcentaje de hembras en celo, con una aparición temprana de los signos de celo acompañados de ovulación, cuando estas son tratadas durante la fase luteal temprana (Acritopoulou y Haresign, 1980; Rubianes et al., 2003). Desde el punto de vista práctico, esto pudiera ayudar a establecer el diseño de un protocolo ultracorto de sincronización de celo con $\text{PGF}_{2\alpha}$, debido a que el CL responde a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir del Día 3 del ciclo estral (Rubianes et al., 2003).

En base a esta hipótesis se diseñó el experimento 2 de la presente memoria.

4.2. Objetivo 2. Respuesta ovárica y endocrina en ovejas tropicales tratadas con diferentes dosis de un análogo de prostaglandina F_{2α} (cloprostenol)

El objetivo general de este experimento fue evaluar la respuesta ovárica y endocrina a la administración de diferentes dosis de un análogo de prostaglandina F_{2α} (Planate®, Schering-Plough; 87,5 µg de cloprostenol/ml), con la finalidad de establecer una dosis más baja y efectiva para ser aplicada en protocolos de sincronización del celo y la ovulación en ovejas de raza West African. Para ello se usaron 68 ovejas (entre 2 y 5,5 años de edad), con un peso promedio de 37,2 ± 0,5 kg, y con una condición corporal media de 2,8.

Esta fase experimental se realizó en tres estudios consecutivos. El objetivo del primero fue evaluar la actividad luteolítica de tres dosis diferentes de cloprostenol; el objetivo de la segunda prueba fue evaluar la efectividad de dosis bajas de cloprostenol, en comparación con la dosis utilizada habitualmente, para la sincronización del celo en protocolos con administración de dos dosis separadas 9 días entre sí. El objetivo del tercer estudio se desarrolló a partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, con el fin de confirmar la efectividad de la dosis más baja para sincronizar el celo, y determinar posibles cambios en el momento de aparición del celo, la descarga preovulatoria de LH y la ovulación con respecto a la dosis habitual.

En el primer experimento (*Experimento 1*), para valorar *la capacidad luteolítica* de tres dosis diferentes de cloprostenol, se utilizaron 20 animales procedentes del rebaño experimental del CENIAP, que fueron seleccionados en base a la presencia de, al menos, un CL (detectado por ecografía transrectal). Seguidamente, se les administró una dosis estándar o alta (n = 8, A = 126 µg; 1,44 ml; Acryptopoulou et al., 1977; 1981; Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añoover et al., 2007), media (n = 6, M = 68,25 µg; 0,78 ml) y baja o equivalente aproximadamente a un tercio de la dosis alta (n = 6, B = 38,5 µg; 0,44 ml). El momento de administración de la hormona fue considerado como Día 0. En los días 0, 3 y 6, se valoró, mediante ecografía transrectal, la presencia, número y tamaño (área) de los cuerpos lúteos. Asimismo, la funcionalidad luteal se determinó mediante el análisis de los niveles plasmáticos de progesterona en una muestra de sangre obtenida de vena yugular coincidiendo con cada evaluación ecográfica.

El segundo experimento (*Experimento 2*) fue realizado en 24 ovejas con CL, las cuales fueron igualmente seleccionadas por ecografía, con el objetivo de evaluar *la efectividad de cada una de estas dosis de cloprostenol sobre la sincronización de celos y la generación de ovulaciones funcionales*. En este sentido, en cada uno de los ocho animales asignados en cada grupo, se administraron dos inyecciones de cloprostenol

con 9 días de separación. La presencia y actividad de cuerpos lúteos fueron determinadas mediante ultrasonografía transrectal y valoración de los niveles plasmáticos de P_4 , en el momento de la primera (día -9) y segunda (día 0) administración de cloprostenol, así como en los días -6 y -2 antes de la segunda inyección y en el día 11. La detección del momento de aparición de sintomatología de celo fue llevada a cabo usando moruecos enteros (ver anexo I). Asimismo, se tomaron muestras de sangre al día -9, 0 y a las 24, 48 y 72 horas después de la segunda inyección para determinar la regresión luteal (niveles de P_4) y la actividad de los folículos preovulatorios (niveles de estradiol; E_2 -17 β).

El tercer experimento (*Experimento 3*) fue diseñado a partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Su primer objetivo fue valorar el efecto de la dosis estándar frente a una inferior, sobre las *características preovulatorias* (dinámica folicular) y *periovulatorias* (momento e intervalos celo-pico preovulatorio de LH-ovulación) del celo inducido. El segundo objetivo fue determinar *si las diferencias en la tasa de ovulación* con las diferentes dosis de cloprostenol encontradas en el segundo experimento *estuvieron o no relacionadas con variaciones de estos parámetros*.

Para ello, un total de 24 ovejas fueron tratadas con dos dosis de cloprostenol, separadas 9 días entre sí. Un primer grupo de 12 ovejas fue tratado con la dosis alta de cloprostenol ($A = 126 \mu\text{g}$; 1,44 ml); el segundo grupo fue tratado con un ajuste de la dosis más baja utilizada en los replicados anteriores para conseguir un volumen de más fácil manejo ($BA = 43,75 \mu\text{g}$; 0,50 ml). En forma similar al experimento anterior, inmediatamente antes de realizar la primera y segunda administración de la hormona (Días -9 y 0) y en los días -6, -2, 8 y 11, se procedió a ecografiar y tomar una muestra de sangre a cada animal con la finalidad de caracterizar los cuerpos lúteos. Asimismo, la caracterización del crecimiento folicular fue realizada mediante ecografía en el momento de la segunda administración de cloprostenol (día 0) y 24 horas más tarde. El inicio del celo fue determinado mediante montas controladas (ver anexo I). Asimismo, durante ese mismo período, se tomaron muestras de sangre con la finalidad de determinar el momento de la descarga preovulatoria de LH. La valoración del momento de la ovulación se realizó mediante ecografías transrectales, realizadas cada 4 horas desde 16 horas después de la aparición del celo.

Cabe destacar que un animal del grupo A (Exp. 3) fue eliminado por problemas reproductivos.

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos, los datos fueron combinados para evaluar, de forma general, la capacidad de los diferentes tratamientos para inducir luteolisis y sincronización del

celo; ordenándose, asimismo, los datos de los diferentes experimentos de forma combinada en cuanto a la cronología de los eventos periovulatorios.

4.2.1. Resultados

4.2.1.a. Efectividad de las diferentes dosis de cloprostenol para la inducción de la luteolisis y sincronización del celo.

En todos los experimentos, el número y tamaño de los CLs, así como su actividad en base a la secreción de progesterona, fueron similares entre grupos en el momento de la inyección de cloprostenol (día 0).

En el primer ensayo, todos los animales presentaron luteolisis en respuesta a la administración de cloprostenol, a excepción de una oveja perteneciente al grupo tratado con la dosis habitual. En el *segundo experimento*, tanto la primera como la segunda inyección de cloprostenol (día -9 y 0) fueron adecuadas para inducir luteolisis en todas las ovejas tratadas con la dosis alta; la actividad luteolítica producida por las dosis baja y media fue efectiva en el 87,5 (7/8) y 75,0% (6/8) de las ovejas, respectivamente. En la tercera experiencia, todas las dosis fueron efectivas para inducir luteolisis en todos los animales.

4.2.1.b. Dinámica folicular del folículo preovulatorio y la secreción de estradiol

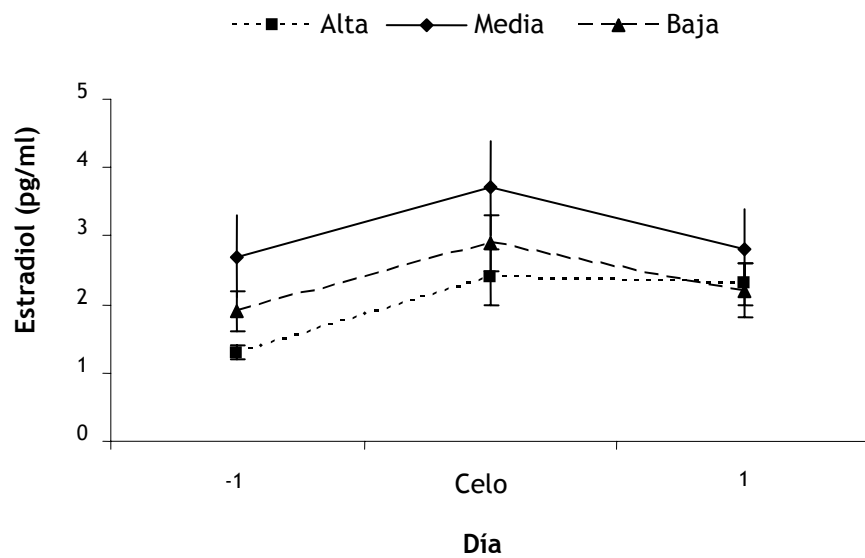
El análisis de la dinámica de los folículos preovulatorios en el tercer experimento no mostró diferencias en cuanto al tamaño medio del primer (FI) y segundo (FII) folículos ovulatorios, ni en el momento de la segunda administración de cloprostenol (FI: $3,9 \pm 0,3$ y $4,0 \pm 0,2$ mm; FII: $3,3 \pm 0,3$ y $3,5 \pm 0,5$ mm), ni 24 horas después (FI: $5,1 \pm 0,3$ y $4,9 \pm 0,2$ mm; FII: $4,3 \pm 0,2$ y $4,1 \pm 0,2$ mm, para las dosis alta y baja respectivamente).

La función folicular, en términos de secreción de estradiol (*Experimentos 2 y 3*), fue también similar en ambos grupos (Figura 3A y B).

4.2.1.b. Momentos e intervalos de las apariciones de celo, onda preovulatoria de LH, ovulación y función luteal.

Los niveles basales de LH, así como la duración de la onda preovulatoria, fueron similares entre los grupos A y BA. Sin embargo, el pico preovulatorio de LH fue mayor en el grupo BA que en el grupo A, en términos de concentración máxima de LH ($P < 0,05$; $27,7 \pm 1,8$ vs $21,3 \pm 2,2$ ng/ml) y AUC ($P < 0,01$; $183,4 \pm 12,7$ vs $127,7 \pm 10,9$ ng/ml; Tabla 3). Igualmente, el inicio del celo estaba positivamente correlacionado con el inicio de la onda preovulatoria de LH ($r = 0,666$; $P < 0,01$) y el pico de LH ($r = 0,777$; $P < 0,001$).

A



B

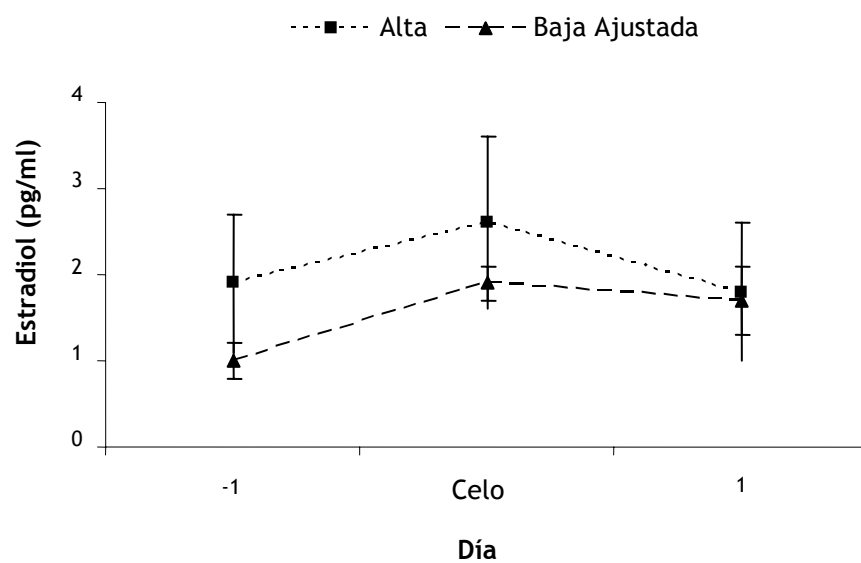


Figura 3. Niveles plasmáticos de estradiol, alrededor del día del celo (Día E) en: A- ovejas WA sincronizadas con la dosis alta, media y baja de cloprostenol. B- ovejas WA sincronizadas con la dosis alta y baja ajustada de cloprostenol.

Tabla 3. Porcentajes de celos, intervalo tratamiento-celo y duración del celo en ovejas WA tratadas con las dosis Alta/Comercial, Media y Baja de cloprostenol.

	Porcentajes de celos	Intervalo Tratamiento-celo (horas)	Duración del celo (horas)
Experimento 2			
Dosis			
Alta (126 µg)	100% (7/7)	28,6 ± 1,8 ^a	37,7 ± 4,4
Media (68,25 µg)	100% (6/6)	34,4 ± 1,0 ^{ab}	36,0 ± 2,8
Baja (38,5 µg)	100% (8/8)	37,1 ± 2,4 ^b	36,0 ± 4,0
Experimento 3			
Dosis			
Alta (126 µg)	81,8% (9/11)	40,4 ± 1,4	-
Baja Ajustada (43,75 µg)	83,3% (10/12)	35,6 ± 1,9	-
a ≠ b: P < 0,05			

Los niveles basales de LH, así como la duración de la onda preovulatoria, fueron similares entre los grupos A y BA. Sin embargo, el pico preovulatorio de LH fue mayor en el grupo BA que en el grupo A, en términos de máxima concentración alcanzada durante la descarga preovulatoria ($P < 0,05$; $27,7 \pm 1,8$ vs $21,3 \pm 2,2$ ng/ml) y área bajo la curva (AUC, $P < 0,01$; $183,4 \pm 12,7$ vs $127,7 \pm 10,9$ ng/ml; Tabla 4). Igualmente, el inicio del celo estaba positivamente correlacionado con el inicio de la onda preovulatoria de LH ($r = 0,666$; $P < 0,01$) y el pico de LH ($r = 0,777$ $P < 0,001$).

Los intervalos tratamiento-ovulación y celo-ovulación no presentaron diferencias para ambos grupos. Hubo una relación positiva entre el inicio del celo y el momento de la ovulación ($r = 0,571$; $P < 0,05$). Por otro lado, no hubo diferencias entre grupos en los intervalos entre el tratamiento-ovulación, pico de LH-ovulación y celo-ovulación.

En el segundo experimento, la tasa de ovulación, valorada en el día 11, fue de $1,4 \pm 0,2$; $1,4 \pm 0,2$ y $1,8 \pm 0,3$ para los grupos tratados con las dosis alta, media y baja, respectivamente. Asimismo, no hubo diferencias en la tasa de ovulación y el área del CL para los grupos A y BA en el día 11 (Tabla 4).

Tabla 4. Características periovulatorias en ovejas WA tratadas con dosis alta (126 µg) y baja ajustada (43,75 µg) de cloprostenol.

	Alta (9/11)	Baja Ajustada (10/12)
Momento de la ovulación (horas)	60,4 ± 2,4	58,4 ± 2,8
Intervalo Celo-Ovulación (horas)	20,0 ± 1,6	22,8 ± 2,4
Intervalo pico de LH-ovulación (horas)	9,3 ± 2,2	11,1 ± 2,6
Perfiles de la onda de LH		
Niveles basales (ng/ml)	0,56 ± 0,1	0,50 ± 0,1
Máxima concentración de la onda (ng/ml)	21,3 ± 2,2 ^a	27,7 ± 1,8 ^b
Inicio de la onda preovulatoria (horas)	40,9 ± 1,3	38,7 ± 2,0
Duración de la onda preovulatoria (horas)	17,3 ± 0,7	19,6 ± 0,8
Fin de la onda preovulatoria (horas)	58,2 ± 1,2	58,2 ± 2,3
Momento del pico de LH (horas)	48,0 ± 1,2	46,2 ± 2,0
AUC (ng/ml)	127,7 ± 10,9 ^c	183,4 ± 12,7 ^d
Niveles de P4 al día 8 (ng/ml)	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Niveles de P4 al día 11 (ng/ml)	3,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2
Número de CLs al día 11	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Área del CL al día 11 (mm ²)	102,3 ± 9,3	90,1 ± 6,3
A ≠ b: P < 0,05; c ≠ d: P < 0,01; AUC: área bajo la curva		

4.2.2. Discusión

El análisis combinado de los tres ensayos, demostró la eficacia de las dosis más bajas para la inducción de la luteolisis y, por lo tanto, para la sincronización del celo y la ovulación en ovejas de raza West African. La eficacia que posee la dosis (i.m.) estándar de cloprostenol (alrededor de 125 µg), para producir la lisis del tejido luteal es bien conocida (Acritopoulou et al., 1977; Tsonis et al., 1984; Campbell et al., 1990; Gonzalez-Bulnes y otros., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007); sin embargo, el presente estudio es, hasta el momento, el primero que evalúa la eficacia de dosis reducidas de cloprostenol. Los resultados obtenidos contradicen los datos de un estudio previo en ovejas, donde se evaluó la eficiencia de una dosis reducida de dinoprost (de 24 a 8 mg; la aparición de celos disminuyó de 93 a 17%; Fukui y Roberts, 1981). No obstante, otros estudios llevados a cabo en cabras (de 5 a 2,5 mg; Torres et al., 1996) y en vacas (de 25 a 17,5 mg; García-Winder y Gallegos-Sánchez, 1991), reportan una respuesta eficiente de la dosis baja de dinoprost. En vacas, la eficacia de las dosis reducidas del cloprostenol puede ser mejorada usando la inyección intravulvar (Horta et al., 1986), pero tendría el inconveniente de ser más laborioso al momento de sincronizar un mayor número de ovejas.

La capacidad luteolítica similar de dosis bajas y estándar de cloprostenol puede relacionarse con el hecho de que la luteolisis consiste en una serie de eventos complejos y no en uno simple. Durante los ciclos naturales o no inducidos, la secreción inicial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endógena por el endometrio, en ausencia de preñez, estimula la secreción de oxitocina a nivel del CL; la oxitocina, a su vez, amplifica la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial (McCracken et al., 1999; Weems et al., 2006). Por otra parte, la disminución de la secreción de la P_4 , que ocurre al inicio de la luteolisis, permite que el estradiol actúe, por una parte, sobre el pulso generador de oxitocina a nivel hipofisiario, y por otra, sobre el incremento del número de receptores para oxitocina en el endometrio, aumentando así, la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (McCracken et al., 1999).

La evaluación de las características del crecimiento del folículo preovulatorio, durante las fases foliculares estudiadas, demostró que la dinámica de desarrollo y la funcionalidad de estos folículos, en términos de secreción de estradiol, fueron similares. Los patrones de crecimiento de los folículos preovulatorios y de la secreción del estradiol fueron similares a lo descrito tanto en ovejas tratadas con análogos de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (Acritopoulou et al., 1977; Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007) como en ovejas no sincronizadas (Acritopoulou et al., 1977; objetivo 1 de la presente Tesis). Así mismo, el intervalo tratamiento-inicio del celo, fueron similares a lo descrito, previamente, en ovejas tratadas con las dosis estándar de cloprostenol (Acritopoulou et al., 1977; Gonzalez-Bulnes et al., 2005) y dinoprost (Keisler, 2007). Al analizar por separado el inicio del estro, en el segundo y tercer experimentos, se encontró que las diferencias significativas en el segundo ensayo no

fueron confirmadas en el tercer experimento. Coincidentemente, en este tercer experimento, las sincronizaciones de la onda preovulatoria de la LH y la ovulación fueron similares entre los grupos.

Sin embargo, observa que las ovejas tratadas con la dosis más baja de cloprostenol, en el segundo experimento, tuvieron un inicio del celo perceptiblemente más tardío, y una tasa de ovulación ligeramente más alta. La falta de diferencias significativas en el número de CL puede relacionarse con que esta variable es de carácter discontinuo (Lindsay y otros. 1993), por lo que la evaluación de los cambios en la tasa de la ovulación requiere un mayor número de animales (Viñoles 2003). De todas formas, es bien conocida la relación existente entre la tasa de disminución de los niveles plasmáticos de progesterona y el inicio del estro (McCracken et al., 1999; Weems et al., 2006). También se ha establecido que un intervalo extendido entre el reclutamiento del folículo y la onda preovulatoria de LH está relacionado con una mayor tasa ovulación (Scaramuzzi et al., 1993; Evans, 2003). Así, se presume que, en la secuencia de los acontecimientos descritos previamente, una dosis más baja de prostaglandina puede tomar más tiempo para inducir una luteolisis que una dosis más alta y, por lo tanto, el inicio del celo y la onda preovulatoria de LH estarían retrasados, permitiendo que más folículos preovulatorios concluyan su crecimiento. Sin embargo, esta hipótesis no fue confirmada por los resultados obtenidos en el tercer estudio, específicamente en lo referente al desarrollo folicular y las sincronizaciones de la onda preovulatoria de la LH y de la ovulación. No obstante, esto último no puede dejar a un lado la realización de futuros estudios, empleando un mayor número de animales, ya que en este último experimento, la dosis baja presentó una mayor secreción total de la LH.

La efectividad del tratamiento en cuanto respuesta hipofisiaria, traducido en secreción de LH y la funcionalidad ovárica, en términos de crecimiento del folículo y secreción del estradiol, fue confirmada en el tercer experimento, en que se valoraron el número de CLs, el área del tejido luteal y la secreción de progesterona. Los valores obtenidos fueron nuevamente similares a los descritos previamente en ovejas sincronizadas (Gonzalez-Bulnes et al., 2005) y no sincronizadas (Godfrey et al., 1997; objetivo 1 de la presente Tesis).

En resumen, los resultados obtenidos demuestran que dosis reducidas de cloprostenol son eficaces para inducir la luteolisis y sincronizar el estro, descarga preovulatoria de LH y ovulación en ovejas cíclicas, para generar un CL funcionalmente normal. Así, estos protocolos pueden, así, formar parte de la práctica en el manejo reproductivo de la oveja, con la ventaja adicional de reducción del costo del tratamiento.

4.3. Objetivo 3. Eficiencia del uso combinado de un protocolo corto de dos inyecciones de cloprostenol y el “efecto macho” sobre la sincronización del celo en ovejas tropicales.

La finalidad del presente experimento fue diseñar y evaluar la eficiencia de un protocolo “corto” de sincronización del celo, en combinación con el “efecto macho”, en ovejas West African. En esta ocasión, se llevaron a cabo tres experimentos con 117 animales (entre 2 y 5 años de edad), con un peso y una condición corporal de $36,7 \pm 0,4$ kg y $2,9 \pm 0,05$, respectivamente.

En los tres experimentos, los tratamientos fueron basados en la administración intramuscular de 43,75 µg de cloprostenol (0,5 ml de Planate®, Schering-Plough, Caracas, Venezuela); dosis inferior a la estándar, pero efectiva para inducir la sincronización del celo y ovulación en ovejas West African, como se ha demostrado en el Objetivo 2 de la presente Memoria de Tesis.

En un primer experimento (*Experimento 1*), se utilizaron 24 ovejas West African, en las que se sincronizó el celo con dos dosis de cloprostenol con 9 días de separación y posteriormente se detectó el celo dos veces por día (8:00 y 17:00 horas), usando un morueco entrenado para tal fin. Posteriormente, las ovejas fueron distribuidas al azar en tres grupos (n = 8), que recibieron una tercera dosis de cloprostenol en los días 3, 5 y 7 después de la ovulación (grupos D3, D5 y D7, respectivamente). En el momento de administrar la tercera dosis de cloprostenol y 10 días después, se valoró el número, tamaño y funcionalidad de los cuerpos lúteos, por medio de ecografía transrectal y determinación de los niveles de P₄ en plasma (ver anexo I). Posteriormente, a la administración de la tercera dosis, se llevó a cabo la detección de los celos (ver Anexo I), así como la determinación de la ovulación y de los perfiles de la onda preovulatoria de LH; por ecografía y muestras de sangre, respectivamente (ver anexo I).

El *Experimento 2* fue diseñado a partir de los resultados obtenidos en el primer experimento. Para ello, se usaron 24 ovejas aisladas de los machos por un periodo de 30 días y luego tratadas con dos dosis de cloprostenol, con siete días de intervalo. En la mitad de las hembras (n = 12; grupo EM), se llevó a cabo la inducción del “efecto macho” en el momento de la segunda administración de cloprostenol (considerado como día 0 para propósitos experimentales), mientras que el resto de las ovejas (grupo control; CTR), permaneció aislado de los moruecos durante la prueba. Por esta razón, la observación de los signos de celo fue realizada únicamente en el grupo EM, usando moruecos epididimiectomizados (ver anexo I).

Con la finalidad de detectar alguna posible influencia del estatus luteal, sobre la respuesta a los diferentes tratamientos, las características de los CLs (número, tamaño y secreción de progesterona), se evaluaron mediante ecografías transrectales y muestras de sangre, en el momento de la primera (día -6) y segunda inyección (día 0) de cloprostenol. Igualmente, se determinaron las características (número, tamaño y secreción de progesterona) de los CL inducidos, en el día 10 después de la segunda dosis de cloprostenol.

Adicionalmente, en el día 0, se valoró mediante ultrasonografía, en todos los animales, la presencia de folículos $\geq 4,5$ mm. Asimismo, se tomaron muestras de sangre en los días 0, 1, 2 y 3, con la finalidad de determinar la función folicular (secreción de estradiol; ver anexo I).

Por último, la evaluación de las características periovulatorias, se llevó a cabo mediante la determinación de la descarga preovulatoria de LH por medio de la obtención de muestras de sangre, así como mediante la detección del momento de la ovulación por ecografías transrectal (ver anexo I).

El tercer experimento (*Experimento 3*) fue realizado con 69 ovejas, con la finalidad de comparar los índices de fertilidad obtenidos con un protocolo convencional de sincronización del celo mediante esponjas intravaginales impregnadas con progestágenos y con el protocolo combinado de cloprostenol y “efecto macho” diseñado en el experimento anterior. Para ello, un primer grupo de hembras (grupo FGA; $n = 20$) fue tratado, durante 12 días, con esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA, Chronogest®, Intervet International, Boxmeer, Holanda). El resto de las ovejas (grupo EM, $n = 49$), fueron tratadas con dos dosis bajas de cloprostenol, con 7 días de intervalo, y expuestas al “efecto macho” en el momento de aplicar la segunda dosis.

Con la finalidad de evaluar el momento más adecuado para realizar la inseminación en el grupo EM, las 49 ovejas pertenecientes a este grupo fueron separadas en dos subgrupos (grupo EM48, $n = 24$; y grupo EM55, $n = 25$). Todas las hembras, incluido el grupo FGA, fueron inseminadas por vía vaginal, al mismo tiempo y por el mismo operador, usando una dosis de semen fresco (en pajuelas de 0,25 ml con 220×10^6 espermatozoides). Estas inseminaciones fueron realizadas en las 48 (grupo EM48, $n = 24$) y 55 horas (grupo FGA y EM55, $n = 25$) posteriores a los respectivos tratamientos. La tasa de fertilidad fue determinada por medio de ultrasonografía transrectal en el día 45 después de la inseminación.

Cabe destacar que 3 animales del grupo EM y 1 del grupo CTR fueron retirados del ensayo por problemas reproductivos.

4.3.1. Resultados

4.3.1.a. Experimento 1. Respuesta ovárica y endocrina a la administración de cloprostenol durante la fase luteal temprana del ciclo sexual.

La respuesta a la administración de cloprostenol, fue similar entre los tres grupos tratados. La función folicular, en cuanto secreción de estradiol, durante la fase folicular inducida (Figura 4), no mostró diferencias entre los grupos tratados. Asimismo, no se observó efecto del tratamiento sobre el porcentaje de animales que presentaron signos de celo, aunque si hubo un inicio del celo más temprano, aunque no alcanzó significación estadística, en el grupo D3 que en el D7 ($28,6 \pm 3,3$ versus $36,6 \pm 3,6$ horas, respectivamente), presentando el D5 un valor intermedio ($34,3 \pm 2,1$ horas; Tabla 5).

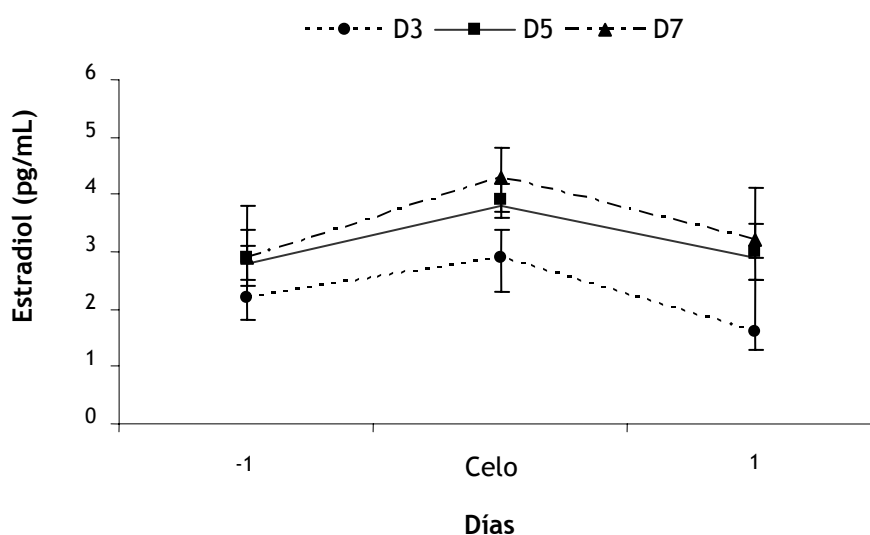


Figura 4. Niveles plasmáticos de estradiol, alrededor del día del celo (Día 0) en ovejas WA tratadas con una dosis de $43,75 \mu\text{g}$ de cloprostenol en los días 3, 5 y 7 (D3, D5 y D7) después de la ovulación.

Con respecto a la descarga de la onda preovulatoria de la LH, se observó que la duración fue similar en los grupos estudiados. No obstante, el inicio y final de la onda fueron más tempranos en el grupo D3 que en los grupos D5 y D7 ($P < 0,01$ para el inicio y $P < 0,001$ para el final; Tabla 5). Esto, igualmente, se reflejó en el momento en que la LH alcanzó su máxima concentración; siendo más temprano en el grupo D3 ($P <$

0,001; $36,7 \pm 1,9$ horas) que en los grupos D5 y D7 ($44,6 \pm 2,4$ y $50,9 \pm 1,7$ horas, respectivamente). No obstante, el momento de la ovulación fue nuevamente similar entre los grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Características periovulatorias en ovejas West African tratadas con cloprostenol en diferentes días del desarrollo luteal (Días 3, 5 y 7, después de la ovulación).

	Día 3	Día 5	Día 7
Porcentajes de celos (%)	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)
Inicio del celo (horas)	$28,6 \pm 3,3$	$34,3 \pm 2,1$	$36,6 \pm 3,6$
Intervalos celos-ovulación (horas)	$23,7 \pm 3,0$	$18,4 \pm 2,7$	$18,3 \pm 4,2$
Momento de la ovulación (horas)	$50,9 \pm 1,7$	$52,0 \pm 1,8$	$54,9 \pm 1,7$
Perfiles de la onda de LH			
Niveles basales (ng/ml)	$0,44 \pm 0,1$	$0,60 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,1$
Máxima concentración de la onda (ng/ml)	$26,3 \pm 2,5$	$28,0 \pm 4,4$	$32,9 \pm 4,8$
Inicio de la onda (horas)	$30,0 \pm 1,7^a$	$36,7 \pm 2,6^b$	$42,9 \pm 1,9^b$
Duración de la onda (horas)	$18,0 \pm 0,9$	$20,0 \pm 1,0$	$18,7 \pm 1,3$
Final de la onda (horas)	$48,0 \pm 2,1^c$	$56,7 \pm 2,4^d$	$60,7 \pm 1,2^d$
Momento del pico de LH (horas)	$36,7 \pm 1,9^c$	$44,6 \pm 2,4^e$	$50,9 \pm 1,7^e$
AUC (ng/ml)	$148,0 \pm 20,4$	$165,4 \pm 24,5$	$196,9 \pm 29,1$
a \neq b: $p < 0,01$; c \neq d \neq e: $p < 0,001$; AUC: área bajo la curva			

En relación al siguiente ciclo, el estudio de las características de los CL en el día 10 mostró diferencias ($P < 0,05$) entre los grupos D3 y D7, específicamente en lo referente al número ($1,9 \pm 0,3$; $1,8 \pm 0,2$ y $1,3 \pm 0,2$; para D3, D5 y D7, respectivamente) y tamaño de los CLs ($115,1 \pm 14,3$; $100,2 \pm 11,2$ y $75,6 \pm 6,4$ mm², para D3, D5 y D7, respectivamente). Sin embargo, estas diferencias en número y tamaño no se reflejaron en la secreción de progesterona ($5,6 \pm 0,5$; $5,6 \pm 0,4$ y $4,3 \pm 0,7$ ng/ml, para D3, D5 y D7, respectivamente).

4.3.1.b. Experimento 2. Respuesta ovárica y endocrina a un protocolo de sincronización del celo mediante cloprostenol con o sin inducción de “efecto macho”.

En el inicio del tratamiento (día -6), 8/9 y 10/11 ovejas de los grupos EM y CTR, respectivamente, presentaron al menos un CL. El estatus luteal (en cuanto número, tamaño y función de los CLs) fue similar entre ambos grupos, tanto en el momento de la primera (Día -6) como de la segunda (Día 0) inyección de cloprostenol. Asimismo, todas las ovejas del grupo EM (9/9) y el 81,8 % (9/11) del grupo CTR presentaron folículos $\geq 4,5$ mm de diámetro en la ultrasonografía realizada al aplicar la segunda inyección en el día 0.

Tabla 6. Efecto de la presencia o ausencia del “efecto macho” sobre las características periovulatorias en ovejas West African tratadas con un protocolo corto de sincronización del celo (datos 7 días a parte)

	ME (9)	CTR (11)
Porcentajes de celos (%)	100	-
Inicio del celo (horas)	32,4 \pm 2,6	-
Intervalos celos-ovulación (horas)	18,0 \pm 1,3	-
Momento de la ovulación (horas)	49,5 \pm 3,4 ^c	61,1 \pm 1,1 ^d
Perfiles de la onda de LH		
Niveles basales (ng/ml)	0,73 \pm 0,1 ^a	0,45 \pm 0,1 ^b
Máxima concentración de la onda (ng/ml)	22,9 \pm 2,4	28,3 \pm 2,4
Inicio de la onda (horas)	28,6 \pm 3,5	37,8 \pm 2,0
Duración de la onda (horas)	19,3 \pm 0,6	18,5 \pm 1,1
Final de la onda (horas)	46,9 \pm 3,6	55,5 \pm 1,2
Pico de LH (horas)	35,0 \pm 2,9 ^a	44,0 \pm 1,6 ^b
ÁUC (ng/ml)	117,9 \pm 7,8 ^a	153,2 \pm 13,0 ^b
a \neq b: P < 0,05; c \neq d: P < 0,01; AUC: área bajo la curva		

Posteriormente, todos los animales presentaron luteolisis en respuesta a la segunda dosis de cloprostenol; observándose celos a las $32,4 \pm 2,6$ horas en las ovejas del grupo EM.

En relación a la descarga preovulatoria de LH, tanto el inicio como el momento en que alcanzó la máxima concentración de LH fueron más tempranos en el grupo EM que en el grupo CTR ($P < 0,05$). La concentración total de LH fue menor en el grupo EM, en términos de AUC ($P < 0,05$; Tabla 6), a pesar que este grupo tuvo una concentración basal mayor ($P < 0,01$) que el grupo CTR. Esto se reflejó en que todas las ovejas del grupo EM, presentaran una ovulación más temprana (9/9; $49,5 \pm 3,4$; 32-56 horas) que las ovejas del grupo CTR (7/11; $61,1 \pm 1,1$; 52-64 horas; $P < 0,01$).

Los análisis del número ($1,3 \pm 0,2$ frente a $1,6 \pm 0,2$), tamaño ($87,4 \pm 10,2$ y $106,6 \pm 8,4$ mm²) y funcionalidad ($6,2 \pm 0,7$ y $6,8 \pm 0,5$ ng/ml) de los CL generados, fueron similares para los grupos EM y CTR, respectivamente.

4.3.1.c. Experimento 3. Tasas de fertilidad después de la inseminación artificial.

El análisis estadístico no demostró diferencias entre grupos; no obstante, la tasa de fertilidad en las ovejas tratadas con cloprostenol y “efecto macho”, e inseminadas a las 48 horas (grupo EM48) fue numéricamente mayor, respecto las ovejas inseminadas a las 55 horas (EM55) o tratadas con progestágenos e inseminadas a las 55 horas (FGA55; 62,5; 44,0 y 47,4%, respectivamente).

4.3.2. Discusión

De los experimentos llevados a cabo en el presente estudio, se puede considerar tres principales resultados. Primero, que la presencia de CLs en etapas iniciales de desarrollo o de 3 días, son capaces de ser lisados, mediante la administración de cloprostenol; produciéndose un inicio más temprano de la onda preovulatoria de LH, que en aquellos CLs que pertenecen a fases luteales más avanzadas. Segundo, el momento de la onda preovulatoria de LH y la ovulación, puede ser adelantado y mejor agrupado, cuando se realiza la introducción de los machos al momento de la segunda inyección de cloprostenol (por ejemplo: mediante el uso del “efecto macho”). Tercero, la combinación de ambas herramientas (luteolisis durante la fase luteal temprana y el “efecto macho”), con el uso de la inseminación artificial, aplicada a las 48 horas después del tratamiento, permiten obtener una tasa de fertilidad comparable, a aquellos logrados en protocolos clásicos, basados en el uso de progestágenos.

Con respecto a los resultados del primer experimento, estos demostraron que la administración de cloprostenol, en CLs de 3, 5 y 7 días después de la ovulación, es tan efectiva como en los tratamientos aplicados, convencionalmente, en fases luteales más avanzadas (Acriptopoulou et al., 1978). A pesar de que existen estudios previos, que indican una menor actividad luteolítica y de presentación de celos en ovejas -con cuerpos lúteos de 3 días- tratadas con cloprostenol (Acriptopoulou y Haresign, 1980) o dinoprost (Pope y Cárdenas, 2004); los resultados en el presente estudio, coinciden con los obtenidos en ovejas de lana, tratadas con 160 µg de delprostenato, a los 3 y 5 días (Rubianes et al., 2003). No obstante, el CL puede ser refractario al tratamiento con cloprostenol, cuando este se administra a los días 1 y 2 después de la ovulación (Acriptopoulou y Haresign, 1980; Wiltbank y Niswender, 1992; Rubianes et al. 2003).

Los estudios llevados a cabo en ovejas de lana, han reportado una aparición de signos de celos más temprano (Rubianes et al., 2003) y un mayor porcentaje de ovulaciones (Rubianes et al., 1997), cuando estas son tratadas durante la fase luteal temprana, que en aquellas tratadas en etapas más avanzadas del desarrollo luteal. Este hecho, puede estar relacionado, con una alta frecuencia de folículos en crecimiento durante la primera onda de desarrollo folicular, el cual coincide con la fase luteal temprana (Ginther et al., 1995; Bartlewsky et al., 1999b). Es probable, que en etapas más avanzadas del desarrollo luteal, haya una falta de sincronización de las ondas foliculares, atribuido esto a una alta variabilidad individual y causando así, una extensión de la vida media de los folículos que están ovulando así como también la ovulación de algunos folículos que emergieron después del tratamiento (Viñoles y Rubianes, 1998; Barrett et al., 2002). Estas diferencias no fueron detectadas durante los primeros días (3 y 5) del ciclo tanto en el presente estudio así como en estudios anteriores (Rubianes et al., 2003), pero si se evidenció entre las ovejas tratadas los 3 y

5 días y aquellas tratadas a los 7 días después de la ovulación, traducándose esto, con un incremento significativo en el número de los CLs, en los grupos D3 y D5.

En relación a la onda preovulatoria de LH, esta presentó un inicio más temprano en ovejas tratadas el día 3 después de la ovulación. Entre las posibles causas que pueden estar relacionadas con este hecho, está el desarrollo de los cuerpos lúteos y la cantidad de P_4 que ellos secretan. En este sentido, es bien conocido que la P_4 inhibe la secreción pulsátil de LH, lo que trae como consecuencia, que los pulsos de secreción son más deprimidos en estados más avanzados de la fase luteal (Baird 1978; Skinner et al., 2000). Por esta razón es posible suponer, que las reestablecimiento de los pulsos de LH hasta alcanzar el pico preovulatorio pudiera ser más temprano, cuando se eliminan CLs que están iniciando su desarrollo, ya que estos secretan menos P_4 .

El inicio y grado de sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación, fueron afectados, en el segundo experimento, por la introducción de los machos al momento de aplicar la segunda inyección de cloprostenol, confirmando y añadiendo más información a otros estudios, realizados en ovejas cíclicas (Hawken, et al., 2007). Por tal razón, la posibilidad de introducir el “efecto macho” para mejorar el protocolo, basado en dosis bajas de cloprostenol administrados durante primeros días del ciclo, fue probado en el siguiente experimento, pero incluyendo la inseminación artificial.

Los resultados del tercer experimento, demostraron, que la combinación de las bajas dosis de cloprostenol, durante las fases tempranas del desarrollo luteal, con el “efecto macho”, puede ser una alternativa adecuada para la sincronización del celo previo a la inseminación artificial sin la necesidad de llevar a cabo detecciones de celo. En este sentido, las tasas de fertilidad obtenidas fueron numéricamente superiores que en las ovejas tratadas con progestágenos, pero sin alcanzar diferencias significativas. No obstante, el bajo número de ovejas usadas en el presente estudio, indican que estos resultados, no pueden ofrecer conclusiones de forma definitiva. Por tal motivo, se hace necesario llevar a cabo estudios adicionales para evaluar la fertilidad, pero empleando un mayor número de animales. A pesar de esto, los resultados obtenidos hasta los momentos, demuestran que el método posee otras ventajas adicionales, tales como el de evitar, principalmente, la presencia de residuos químicos en el organismo.

Adicionalmente, estudios posteriores, pueden ser realizados para mejorar el momento de la inseminación artificial. En el presente estudio, el momento de la inseminación a las 55 horas, fue escogida, en base a los resultados obtenidos en estudios anteriores (Acryptopoulou-Fourcroy et al, 1982), mientras que la inseminación a las 48 horas -inseminación a tiempo fijo- fue realizada con miras a facilitar, de forma practica, el manejo de los animales, siendo esta última opción, la más adecuada; sin embargo, no se puede dejar la evaluación de otros tiempo fijos, comprendido entre las 48 y 55 horas, los cuales podrían mejorar los resultados obtenidos.

Finalmente se puede concluir que el método propuesto, puede ser empleado, como una alternativa a los métodos convencionales, los cuales emplean progestágenos, permitiendo de esta forma, sincronizar el celo y aplicar la inseminación artificial en ovejas tropicales, a lo largo del año. Además, de prescindir del uso de los progestágenos, el método permite reducir los costos, asociados al tratamiento y al manejo de los animales, así como un mejoramiento del bienestar animal, ya que reduce la manipulación de la cavidad vaginal, los cuadros de vaginitis y otras enfermedades asociadas al los genitales externos.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Los trabajos realizados en la presente Memoria Doctoral tuvieron como finalidad *diseñar y establecer un protocolo corto de sincronización del celo, basado en el uso de cloprostenol y el “efecto macho” y validarlo mediante su comparación con los protocolos habituales basados en la administración de progestágenos*, tal como se plasmó, inicialmente, en el objetivo general.

En este sentido, el trabajo estuvo organizado en tres bloques de objetivos. El primero consistió en la determinación de las características del ciclo ovárico, a través del estudio de la dinámica de crecimiento folicular y luteal; para, de esta forma, precisar el momento más adecuado para inducir la lisis temprana del CL a través de la administración de un análogo de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, concretamente el cloprostenol. Seguidamente, se procedió a evaluar la capacidad luteolítica y sincronizadora de celos y de ovulaciones de la aplicación de dosis reducidas de cloprostenol, en comparación con una dosis alta, usualmente empleada en la práctica. Una vez establecida una dosis mínima efectiva, se procedió a diseñar y evaluar la eficiencia de la administración de dos inyecciones de cloprostenol, con un intervalo de 7 días, en combinación con el uso del “efecto macho”.

Los resultados obtenidos en la primera etapa de la presente Tesis demostraron que los patrones de desarrollo folicular en las ovejas de pelo son similares a los descritos en ovejas de lana (Evans, 2003). Asimismo, la mayoría de los ciclos observados en estas ovejas, tuvieron un patrón constante de 3 ondas de desarrollo folicular; correspondiéndose cada una de estas con las fases inicial, intermedia y final del desarrollo luteal.

Al estudiar en desarrollo folicular en cada una de estas ondas, se evidenció un efecto de dominancia por parte del folículo más grande, que se traducía en una disminución en el número de folículos nuevos en el momento en que este folículo dominante alcanzaba su mayor tamaño. Este efecto de dominancia se vio modificado por las diferentes fase del ciclo estral. De esta forma, se observó una disminución en el número de folículos subordinados durante la fase de crecimiento de la primera y tercera onda de desarrollo folicular; siendo significativa esta reducción en la última. No obstante, esta reducción de folículos o efecto de dominancia no se evidenció durante la segunda onda folicular.

En cuanto al desarrollo del CL, se observó una correlación positiva entre la dinámica de crecimiento del CL y el patrón de secreción de P_4 . Asimismo, se detectó la presencia de actividad luteal desde el día 3 del ciclo, hasta dos días antes del siguiente

celo. Durante esta fase, cuando el CL alcanzó su mayor tamaño y secretó las mayores cantidades de P_4 (fase luteal intermedia), se evidenció de manera indirecta, un efecto supresor de carácter *sistémico* por parte del CL sobre el efecto de dominancia ejercida por el folículo de mayor tamaño de la segunda onda. Este efecto supresor puede deberse a que altas concentraciones de P_4 disminuyen la frecuencia de pulsos de LH, necesaria para el desarrollo de los grandes folículos y el establecimiento de los procesos de selección y dominancia (Adams, 1999).

Otro aspecto a resaltar durante esta primera fase experimental, es la evidencia de un posible efecto de carácter *local o intraovárico* que posee el CL sobre la dinámica folicular, traducido en una marcada disminución de los folículos en crecimiento en aquellos ovarios que presentaban CL.

Ambos efectos, *sistémico* y *local*, tiene implicaciones de tipo práctico, ya que comprometen la función folicular durante la fase luteal intermedia; pudiendo afectar la calidad del folículo y fertilidad obtenida tras su ovulación (Johnston et al., 1996; Ungerfeld y Rubianes, 1999; Viñoles et al., 1999).

Estos resultados llevaron al diseño y aplicación de un protocolo de sincronización de celos, mediante inducción de luteolisis en fase luteal temprana o tardía; objetivo abordado en la tercera parte del desarrollo experimental de la presente memoria, pero empleando dosis reducidas de cloprostenol valoradas previamente (Objetivo 2).

Los resultados obtenidos en la segunda fase experimental, los ensayos que se corresponden con el Objetivo 2, demostraron la eficacia de *dosis reducidas* de cloprostenol; en términos tanto de actividad luteolítica como de inducción y sincronización de celo y ovulación.

El hecho de que la actividad luteolítica de, aproximadamente, 1/3 de la dosis de cloprostenol sea tan efectiva como la dosis comúnmente empleada en trabajos anteriores (Acriptopoulou et al., 1977; Tsonis et al., 1984; Campbell et al., 1990; Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007), puede relacionarse con el hecho de que esta inicie, a pesar de la baja dosis, una serie de eventos complejos similares a los observados durante los ciclos naturales o no inducidos (McCracken et al., 1999; Weems et al., 2006).

A pesar de que los patrones del crecimiento de los folículos preovulatorios y de la secreción del estradiol fueron similares entre los grupos tratados (con las dosis alta, media y baja), se encontró que el inicio del celo fue más tardío en el grupo tratado con la dosis baja que el tratado con la dosis alta, mientras que la tasa de ovulación fue ligeramente más alta. Esto podría deberse a que una dosis más baja de prostaglandina

pueda necesitar más tiempo para inducir la luteolisis que una dosis más alta; retrasando el inicio del celo y la onda preovulatoria de la LH, y permitiendo que un número más alto de folículos preovulatorios concluyan su crecimiento. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser confirmada en el siguiente experimento, en que se comparó la dosis alta o habitual con una dosis baja ajustada (ajustada a un volumen de más fácil manejo; de 0,44 a 0,50 ml); en este caso, el desarrollo folicular y el grado de sincronización del celo y la onda preovulatoria de LH y la ovulación fueron similares. Asimismo, el número del CL, área del tejido luteal y secreción de la progesterona fueron similares. Sin embargo, sí se observó que la administración de la dosis baja ajustada se relacionaba con una mayor secreción total de LH; por ello, sería recomendable la realización de ulteriores estudios, empleando un mayor número de animales.

Una vez determinada la efectividad de la dosis baja de cloprostenol, para asegurar con ella una reducción de costo del tratamiento en los protocolos de sincronización de celo, se procedió a desarrollar la tercera etapa del plan experimental con la finalidad de evaluar el momento más adecuado para su administración durante el ciclo.

Los resultados obtenidos en el primer experimento de este tercer Objetivo demuestran que los CLs en sus fases iniciales de desarrollo (día 3 después de la ovulación) son tan susceptibles a la acción luteolítica de dosis bajas de cloprostenol como aquellos CLs en fases más avanzadas de desarrollo (día 7). Asimismo, el tratamiento en el día 3 fue igualmente eficaz para obtener la sincronización del celo y la ovulación.

A pesar de que estudios anteriores, indican una menor actividad luteolítica y presentación de celos en ovejas - con cuerpos lúteos de 3 días- tratadas con cloprostenol (Acryptopoulou y Haresign, 1980) o dinoprost (Pope y Cárdenas, 2004); los resultados en el presente estudio son similares a los obtenidos por Rubianes et al. (2003), que alcanzaron una efectividad del 100 % en ovejas tratadas con 160 µg de delprotenato.

Los estudios llevados a cabo en ovejas de lana, han reportado una aparición de signos de celos más temprano (Rubianes et al., 2003) y un mayor porcentaje de ovulaciones (Rubianes et al., 1997), cuando estas son tratadas durante la fase luteal temprana, en comparación con aquellas tratadas en etapas más avanzadas del desarrollo luteal. Este hecho, puede estar relacionado, con una alta frecuencia de folículos en crecimiento durante la primera onda de desarrollo folicular, el cual coincide con la fase luteal temprana (Ginther et al., 1995; Bartlewsky et al., 1999b). Es probable, que en etapas más avanzadas del desarrollo luteal, haya una falta de sincronización de las ondas foliculares, atribuido esto, a una alta variabilidad

individual, causando así una extensión de la vida media de los folículos que están ovulando así como también la ovulación de algunos folículos que emergieron después del tratamiento (Viñoles y Rubianes, 1998; Barrett et al., 2002). Estas diferencias no fueron detectadas durante los primeros días (3 y 5) del ciclo del presente estudio como en los de Rubianes et al. (2003)

En relación a la onda preovulatoria de LH, esta presentó un inicio más temprano en ovejas tratadas el día 3 después de la ovulación. En este sentido, es bien conocido que la P_4 inhibe la secreción pulsátil de LH, lo que trae como consecuencia, que los pulsos de secreción son más deprimidos en estados más avanzados de la fase luteal (Baird 1978; Skinner et al., 2000). Por esta razón es posible suponer, que el reestablecimiento de los pulsos de LH, hasta alcanzar el pico preovulatorio, pudiera ser más temprano, cuando se eliminan cuerpos lúteos que están iniciando su desarrollo, ya que estos secretan menos P_4 .

El inicio y grado de sincronización del pico preovulatorio de LH y la ovulación, fueron afectados, en el segundo experimento, por la introducción de los machos al momento de aplicar la segunda inyección de cloprostenol, confirmando y añadiendo más información a otros estudios, realizados en ovejas cíclicas (Hawken, et al., 2007).

Por tal razón, los resultados del tercer experimento, demostraron, que la combinación de las bajas dosis de cloprostenol durante las fases tempranas del desarrollo luteal con el “efecto macho”, puede ser una alternativa adecuada para la sincronización del celo previo a la inseminación artificial sin la necesidad de llevar a cabo detecciones de celo. Las tasas de fertilidad fueron numéricamente superiores a aquellas obtenidas en ovejas tratadas con progestágenos, pero sin alcanzar diferencias significativas. No obstante, el bajo número de ovejas usadas en el presente estudio, indican que estos resultados, no pueden ofrecer conclusiones de forma definitiva. Por lo que se hace necesario, llevar a cabo estudios adicionales para evaluar la fertilidad, pero empleando un mayor número de animales. A pesar de esto, los resultados obtenidos hasta los momentos, demuestran que el método posee otra ventaja adicional, como es el de evitar, principalmente, la presencia de residuos químicos.

Adicionalmente, estudios posteriores, pueden ser realizados para mejorar el momento de la inseminación artificial. En el presente estudio, el momento de la inseminación a las 55 horas, fue escogida, en base a los resultados obtenidos en estudios anteriores (Acryptopoulou-Fourcroy et al, 1982), mientras que la inseminación a las 48 horas -inseminación a tiempo fijo- fue realizada con miras a facilitar, de forma práctica, el manejo de los animales, siendo esta última opción, la más adecuada; sin embargo, no se puede dejar la evaluación de otros tiempos fijos, comprendido entre las 48 y 55 horas, los cuales podrían mejorar los resultados obtenidos.

En vista de los resultados obtenidos, la presente Memoria Experimental establece, que el uso de dos administraciones de dosis bajas de cloprostenol, aplicadas con 7 días de separación, y combinadas con el uso del “efecto macho” -en el momento de la segunda inyección- induce de forma eficaz, la sincronización del celo y la ovulación fértil, en ovejas cíclicas.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente memoria doctoral, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. El ciclo sexual de las ovejas de pelo de raza West African presenta un patrón de crecimiento con tres ondas similar al de las razas de lana, y este patrón viene determinado por efectos inhibitorios, sistémicos y locales, del cuerpo lúteo según su estadio de desarrollo.
2. La administración de una dosis reducida de cloprostenol en esta raza, respecto de la habitual en ovejas de lana (126 versus 43,75 µg) es plenamente eficaz para inducir la luteolisis, así como el correspondiente celo y la ovulación.
3. Los tratamientos luteolíticos en la fase temprana del ciclo, día 3, inducen el desarrollo de folículos ovulatorios de mejor calidad y crecimiento más rápido, así como una liberación más temprana y sincronizada de LH y ovulación, todo ello determinado por los efectos inhibitorios del cuerpo lúteo sobre el desarrollo folicular a lo largo del ciclo.
4. La incorporación del “efecto macho” en el momento de la administración de la segunda dosis de cloprostenol en hembras con cuerpo lúteo activo adelanta y agrupa la descarga preovulatoria de LH y la ovulación.
5. El uso de dos inyecciones de cloprostenol separadas siete días, en combinación con “efecto macho” el día de la segunda inyección presenta una respuesta eficaz en términos de desarrollo y funcionalidad folicular y sincronización del celo, descarga de LH y ovulación.
6. El uso del método es eficaz, cuando se aplica inseminación artificial a las 48 horas de la segunda inyección de cloprostenol, respecto de la obtenida mediante el uso de progestagenos e inseminación a las 55 horas; por ello, puede considerarse una buena alternativa para la sincronización de celos en ovejas tropicales.

7. CONCLUSIONS

The results obtained in this Thesis, allow to establish the following conclusions:

1. The interovulatory cycle in hair ewes displays a predominant pattern of three waves of follicular development, which is similar to what described in wool ewes. This pattern is determined by systemic and local inhibitory effects of corpus luteum.
2. As standar dose (126 µg, i.m.) commonly used in wool ewes, the use of reduced doses (43.75 µg, i.m.) of cloprostenol in West African ewes is equally effective for inducing luteolysis, estrus and ovulation.
3. The use of a luteolytic agent during the early phase of the estrous cycle -at day 3- induces a rapid growth of good quality ovulatory follicles. Also, it induces a synchronized and earlier onset of preovulatory LH surge with consequent ovulation. This effect is determined by the inhibitory effects of the corpus luteum on the follicular development during estrous cycle.
4. The incorporation of “male effect” at the timing of the second Cloprostenol injection advances and synchronizes the preovulatory LH surge and ovulation in ewes with active corpus luteum.
5. The combined use of two cloprostenol injections given seven days apart, and of the “male effect” at the day of the second injection, induces/evoques an effective response in terms of follicular function, estrus synchronization, preovulatory LH surge and ovulation.
6. When this method is used with artificial insemination performed at 48 hours after treatment, it has proven to be more effective than the classical synchronization protocol, which requires the use of progestagen and artificial insemination at 55 hours. Thus, it may represent an adequate alternative to the conventional protocol based on progestagens for estrus synchronization.

8. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

- ABISOGUN, A.O., Daphna-Iken, D., Reich, R., Kranzfelder, D. and Tsafirri, A. 1988. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. *Biol. Reprod.* 36: 756-762.
- ACRITOPOULOU, S., Haresign, W., Foster, J.P. and Lamming, G.E., 1977. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F-2alpha. *J. Reprod. Fertil.* 49: 337-340.
- ACRITOPOULOU, S. and Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 58: 219-221.
- ACRITOPOULOU-FOURCROY, S., Pappas, V., Peclaris, G. and Zervas, N. 1982. Synchronization of oestrus in ewes with Provera sponges/PMSG, prostaglandin F2 alpha or the prostaglandin analogue, ICI 80996, and fertility following natural mating or artificial insemination. *Reprod Nutr Dev.* 22: 345-354.
- ADAMS, G.P., Matteri, R.L. and Ginther, O.J., 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 95: 627-640.
- ADAMS, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants-Review. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl.): 17-32.
- ADASHI, E.Y., Resnick, C.E., Brodie, A.M., Svoboda, M.E. and Van Wyk, J.J., 1985a. Somatomedin C mediated potentiation of follicle stimulating hormone induced aromatase activity of cultured rat granulosa cell differentiation. *Endocrinology.* 117: 2313-2320.
- ADASHI, E.Y., Resnick, C.E., Svoboda, M.E. and Van Wyk, J.J., 1985b. Somatomedin C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 261: 3923-3926.
- ADASHI, E.Y., Resnick, C.E., Svoboda, M.E. and Van Wyk, J.J., 1986. Follicle stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 261: 3923-3926.
- AINSWORTH, L. and Wolynetz M.S., 1982. Synchronization of estrus and reproductive performance of ewes treated with synthetic progestogens administered by subcutaneous ear implant or by intravaginal sponge pessary. *J. Anim. Sci.* 54: 1120-1127.
- AL-MAULY, N.Z.N., Bryant, M.J. and Cunninham, F.J., 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the

onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim. Prod.* 53, pp. 209-214.

ÁLVAREZ, R.A.G., Rodríguez, R.O. and Hernández, L.J.J., 1994. Sincronización del estro en ovejas pelibuey con utilización de PGF2alfa. *Tec. Pecu. Mex.* 32: 25-29.

ARMSTRONG, D.T. and Papkoff, H., 1976. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rats in vivo by follicle stimulating hormone. *Endocrinology.* 99: 1144-1151.

ARMSTRONG, D.G. and Webb, R., 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins- Review. *Rev. Reprod.* 2:139-146.

ARROYO, L.J., Gallegos-Sánchez, J., Villa-Godoy, A., Berruecos, J.M., Perera, G., and Valencia, J., 2007. Reproductive activity of Pelibuey and Suffolk ewes at 19 degrees north latitude. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 24-30.

AVDI, M., Chemineau, P. and Driancourt, M.A., 1997. Alterations in follicular maturation associated with within-breed variation in ovulation rate in Chios ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 223-235.

BAIRD, D.T., 1978. Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 18: 359-364

BARRETT, D. M. W., Bartlewski, P. M., Cook, S. J. and Rawlings, N. C. 2002.

Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2 α given at different stages of the luteal phase in ewes. *Theriogenology.* 58: 1409-1424

BARTLEWSKY, P.M., Beard, A.P., and Rawlings, N.C., 1999a. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology.* 52: 115-130.

BARTLEWSKY, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A. and Rawlings, N.C., 1999b. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115: 111-124.

BASERGA, R., 1985. The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge, M.A.

BJERSING, L. and Cajander, S., 1974. Ovulation and the mechanism of follicular rupture. VI. Ultrastructure of theca interna and inner vascular network surrounding rabbits Graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res.* 153: 31-44.

BOROWCZYK, E., Johnson, M.L., Bilski, J.J., Bilska, M.A., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. and Grazul-Bilska, A.T., 2007. Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells in vitro. *Reproduction.* 133: 641-651.

- BYSKOV, A.G., 1974. Does rete ovarii act as a trigger for onset of meiosis. *Nature*. 252: 396-397.
- CAHILL, L.P. and Mauleón, P., 1981. A study of the population of primordial and small follicles in the sheep. *J. Reprod. Fertil.* 61: 201-206.
- CAMPBELL, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 1990. The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology*. 127: 227-235.
- CAMPBELL, B.K., Scaramuzzi, R.J. and Webb, R., 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl.): 335-350.
- CARLES, A.B. and Kipngeno, W.A.K., 1986. The effect of season and the introduction of rams on oestrous activity in Somali, Nandi, Merino, Karakul, and New Zealand Romney Marsch ewes in Kenya. *Anim. Prod.* 43: 447-457.
- CAVENDER, J.L. and Murdoch, W.J., 1988. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. *Biol Reprod.* 39: 989-997.
- CERNA, C., Porras, A., Valencia, M.J., Perera, G. and Zarco, L., 2000. Effect of an inverse subtropical (19°13'N) photoperiod on ovarian activity, melatonin and prolactin secretion in Pelibuey ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 511-525.
- CHAMLEY, W.A., Buckmaster, J.M., Cain, M.D., Cerini, J., Cerini, M.E., Cumming, I.A. and Goding J.R., 1972. The effect of prostaglandin F₂ on progesterone, oestradiol and luteinizing hormone secretion in sheep with ovarian transplants. *J. Endocrinol.* 55: 253-263.
- CHEMINEAU, P., 1983. Effect on estrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J. Reprod. Fert.* 67, pp. 65-72.
- CHEMINEAU, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian oestrus cycles in anovulatory goats – a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, pp. 135-147.
- CHILDS, G.V., 2006. Gonadotropes and lactotropes. In: *The physiology of reproduction*, Volume 1. J.D., Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. pp. 1483-1580.
- CLARKE, I.J. and Pompolo, S., 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim. Reprod. Sci.* 88: 29-55.
- COGNIE, Y., Gray, S.J., Lindsay, D.R., Oldham, C.M., Pearce, D.T. and Signoret, J.P., 1982. A new approach to controlled breeding in sheep using the “ram effect”. *Proc. Austr. Soc. Anim. Prod.* 14: 519-522.
- CONTRERAS, I., Bastidas, P., Verde, O., Rondón, Z., Arango, J. y Díaz, T., 2003. Efecto del aislamiento del carnero durante el parto sobre la actividad

- ovárica postparto en ovejas West African. *Rev. Fac. Cs. Vet.-UCV.*, 44: 77-86.
- CONTRERAS-SOLÍS, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A. y Gonzalez-Bulnes, A., 2007a. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección de folículos ováricos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 1: 10-14.
- CONTRERAS-SOLÍS, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A. y Gonzalez-Bulnes, A., 2007b. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección y medición de cuerpos lúteos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 3: 114-118.
- CORKE D.G., 1980. Use of teasing in A. I. Programme. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 13: 81-82.
- COUZINET, B., Lestrat, N., Brailly, S., Forest, M. and Schaison, G., 1988. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 66: 552-556.
- CRUZ, C., Fernández-Baca, S., Alvarez, L.J.A. and Pérez, R.H., 1994. Variaciones estacionales en la presentación de ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria en ovejas Tabasco en el trópico húmedo. *Vet. Mex.* 25: 23-27.
- DÍAZ, T., 1991. Desarrollo del radioinmunoanálisis para la determinación de progesterona en plasma de yegua, cerda y oveja. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- DÍAZ, C. González Bulnes, A., Haba, E., Guirao, J., Lobera, J.B., Urrutia, B., Carrizosa, J. y López Sebastián, A., 2002. *Jorn. Cientif. SEOC.*, pp. 1017-1021
- DIXIT, V.D. and Parvizi, N., 2001. Nitric oxide and the control of reproduction-Review. *Anim. Reprod. Sci.* 65:1-16
- DONOVAN, A., Hanrahan, J.P., Kummen, E., Duffy, P. and Boland, M.P., 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed semen at a natural or synchronised oestrus. *Theriogenology.* 84:359-368
- DORRINGTON, J.H., Moon, Y.S. and Armstrong, D.T., 1975. Estradiol-17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature rats; stimulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 97: 1328-1331.
- DRIANCOURT, M.A. and Cahill, L.P., 1984. Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 71: 205-211.
- DRIANCOURT, M.A., 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology.* 35: 55-79.
- DRIANCOURT, M.A., Philipon, P., Locatelli, A., Jacques, E. and Webb, R., 1988. Are differences in FSH

- concentration involved in the control of ovulation rate in Romanov and Ile-de-France ewes? *J. Reprod. Fertil.* 83: 509-516.
- DUTT, R.H. and Casida, L.E., 1948. Alteration of estrual cycle in sheep by use of progesterone and its effects upon subsequent ovulation and fertility. *Endocrinology*. 43: 208-217.
- ECHTERNKAMP, S.E., Spicer, L.J., Gregory, K.E., Canning, S.F. and Hammond J.M., 1990. Concentrations of insulin like growth factor 1 in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43: 8-14.
- ELOY, A.M.X., Simplicio, A.A. and Foote, W.C., 1990. Reproduction in sheep. In: *Hair sheep production in tropical and subtropical regions*. W. Shelton and W. Figueredo (Eds.). United States Agency for International Development, Davis, California. Pp. 97-111.
- ENGELAND, B.G., Webb, R. and Dahmer, M.K., 1981. Follicular steroidogenesis and gonadotropin binding to ovine follicles during the estrous cycle. *Endocrinology*. 109: 881-887.
- ESPEY, L.L., 1967a. Ultrastructure of the apex of the rabbits Graafian follicle during the ovulatory process. *Endocrinology*. 81: 267-276.
- ESPEY, L.L., 1967b. Tenacity of porcine Graafian follicle as it approaches ovulation. *A. J. Physiol.* 212: 1397-1401.
- ESPEY, L.L., 1991. Ultrastructure of the ovulatory process. In: *Ultrastructure of the ovary*, Familiari, G., Makabe, S y Motta, P.M. Kluwer. Norwell. pp. 143-156.
- ESPEY, L.L., 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol. of Rep.* 50: 233-238.
- EVANS, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N. and Boland, M.P., 2000. Waves of follicles development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology*. 53: 699-715.
- EVANS, A.C.O., 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 240-246.
- FAO, 2007. Faostat. [en línea]. Dirección URL: <<http://faostat.fao.org>> [Consulta: 15 de Marz. 2008].
- FERNANDEZ, C.A., Tarlatzi, B., Rzasu, P.J., Caride, V.J., Laufer, N., Negro-Vilar, A.F., DeCherney, A.N. and Naftolin, F., 1985. Renin-like activity in ovarian follicular fluid. *Fertil Steril.* 44: 119-122.
- FIELD, P.A., 1991. Relaxin and other luteal secretory peptides: cell localization and function in the ovary. In: *Ultrastructure of the ovary*. G. Familiari, S. Makabe and P.M. Motta (Eds.). Kluwer Academic Press, Boston. Pp. 177-198.

- FINK, G., 1988. Gonadotrophin secretion and its control. In: *The physiology of reproduction*, Volume 2. J.D., Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 1349-1377.
- FLINT, A.P.F., Sheldrick, E.L., Theodosis, D.T. and Wooding, F.B.P., 1986. Ovarian peptides: role of luteal oxytocin in the control of estrous cyclicity in ruminant. *J. Anim. Sci.* 62 (Suppl. 2): 62-71.
- FORTUNE, J.E. and Hansel, W., 1979. The effect of 17β -estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology*. 104: 1834-1838.
- FORTUNE, J.E. and Quirk S.M., 1988. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl 2): 1-8.
- FORTUNE, J.E., 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod.* 35: 292-299.
- GELEZ, H. and Fabre-Nys, C., 2004. The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm. Behav.*, 46: 257-271.
- GIBBONS, J.R., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J., 1997. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* 57: 1066-1073.
- GIBBONS, J.R., Wiltbank, M.C. and Ginther, O.J., 1999. Relationship between follicular development and the decline in the follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* 60: 72-77.
- GINTHER, O.J., Kot, K. and Wiltbank, M.C., 1995. Association between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. *Theriogenology*. 43: 689-703.
- GINTHER, O.J. and Kot, K., 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*. 42: 987-1001.
- GODFREY, R.W., Gray, M.L. and Collins, J.R., 1997a. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 99-106.
- GODFREY, R.W., Hensley, H.L., Collins, J.R. and Wheaton, J.E., 1997b. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *J. Anim. Sci.* 75 (Suppl. 1): 232.
- GODFREY, R.W., Gray, M.L., Collins, J.R., 1998. The effect of ram exposure on uterine involution and luteal function during the postpartum period of hair sheep ewes in the tropics. *J. Anim. Sci.*, 76: 3090-3094.
- GONZALEZ, A., Murphy, B.D., Foote, W.C. and Ortega, E., 1992. Circannualestrous variations and

- ovulation rate in Pelibuey ewes. *Small. Rumin. Res.* 8: 225-232.
- GONZALEZ, R.A., Valencia, M.J., Foote, W.C. and Murphy, B.D., 1991. Hair sheep in Mexico: reproduction in Pelibuey sheep. *Anim. Breed. Abstr.* 59: 509-524.
- GONZALEZ-AÑOVER, P., Encinas, T., Veiga-López, A., Ammoun, I., Contreras, I., Ros, J.M., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F. and Gonzalez-Bulnes, A., 2006. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 29-33.
- GONZALEZ-BULNES, A., Santiago Moreno, J., Gomez Brunet, A. and Lopez Sebastián, A., 2000. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 35: 65-68.
- GONZALEZ-BULNES, A., García-García, R.M., Castellanos, V., Santiago-Moreno, J., Ariznavarreta, C., Domínguez, V., Lopez-Sebastian, A., Tresguerres, J.A., Cocero, M.J., 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 17-28.
- GONZALEZ-BULNES, A., Souza, C.J., Campbell, B.K. and Baird, D.T., 2004. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.* 84:107-119.
- GONZALEZ-BULNES, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R.M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M.A., Tresguerres, J.A., Cocero, M.J., and Flores, J.M., 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology.* 63: 2523-2534.
- GONZALEZ-BULNES, A., Carrizosa, J.A., Urrutia, B., Lopez-Sebastian, A., 2006. Oestrous behaviour and development of preovulatory follicles in goats induced to ovulate using the male effect with and without progesterone priming. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 745-50.
- GOODMAN, A. and Hodgen, G.D., 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39: 1-73.
- GOODMAN, R.L. and Inskoop, K., 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep. In: *The physiology of reproduction*, Volume 2. J.D., Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 2389-2447.
- GOODMAN, R.L., Gibson, M., Skinner, D.C. and Lehman., 2002. Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reproduction.* 59: 41-56.

- GORDON, I., 1975. Hormonal control of reproduction in sheep. *Proc. Br. Soc. Anim. Prod.* 4: 79-93.
- GORE-LANGTON, R.E. and Armstrong, D.T. 1994. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of reproduction*, Volume 1. J.D., Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 331-385.
- GOURLEY D.D. and Riese, R.L., 1990. Laparoscopic artificial insemination in sheep-Review. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6: 615-633.
- GRAZUL-BLISKA, A.T., Reynolds, L.P. and Redmer, D.A., 1997. Minireview: gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* 57: 947-957.
- GRAZUL-BLISKA, A.T., Reynolds, L.P. and Redmer, D.A., 1998. Cellular interactions in the corpus luteum. *Sem. Reprod. Endocrinol.* 15: 383-393.
- GREYLING, J.P.C., Erasmus, J.A., Taylor, G.J. and van der Merwe, S., 1997. Synchronization of estrus in sheep using progestagen and inseminating with chilled semen during the breeding season. *Small Rumin. Res.* 26: 137-143.
- HALPIN, D.M.G. and Charlton, H.M., 1988. Effects of shortterm onjection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. *J. Reprod. Fertil.* 82: 393-400.
- HANSEL, W. and Convey, E.M., 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 (Suppl. 2): 404-424.
- HARTMAN, C.G., 1932. Ovulation and the transport and viability of ova and sperm in the female genital tract. In: *Sex and internal secretion*. Allen, E. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 647-688.
- HAWK, H.W. and Conley, H.H., 1971. Sperm transport in ewes administered synthetic progestagen, *J. Anim. Sci.* 33: 255-256.
- HAWKEN, P.A.R., Beard, A.P., O'Meara, C.M., Duffy, P., Quinn, K.M., Crosby, T.F., Boland, M.P., Evans, A.C.O., 2005. The effects of ram exposure during progestagen oestrus synchronisation and time of ram introduction post progestagen withdrawal on fertility in ewes. *Theriogenology*, 63: 860-871.
- HAWKEN, P.A., Beard, A.P., Esmaili, T., Kadokawa, H., Evans, A.C., Blache, D., Martin, G.B., 2007 The introduction of rams induces an increase in pulsatile LH secretion in cyclic ewes during the breeding season. *Theriogenology*. 68: 56-66.
- HENDERSON, K.M., McNatty, K.P., O'Keefe, L.E., Lun S., Heath, D.A. and Prisk, M.D., 1987. Differences in gonadotrophin stimulated cyclic AMP production by granulosa cell from Booroola x Merino ewes which were homozygous, heterozygous or non carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.* 81: 395-402.

- HERNÁNDEZ, J., Valencia, J. y Zarco, L., 2001. Regresión del cuerpo lúteo y presentación del estro en ovejas con dos inyecciones de prostaglandina con 8 días de intervalo. *Tec. Pecu. Mex.* 39: 53-57
- HSU, C.J. and Hammond, J.M., 1987. Gonadotrophins and estradiol stimulated immunoreactive insulin growth factor 1 production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 120: 198-207.
- HSUEH, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C. and Welsh, T.H., 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cell. *Endocrine Rev.* 5: 76-127.
- IRELAND, J.J., 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil.* 34 (Suppl): 39-54.
- JABLONKA-SHARIFF, A., Grazul-Bliska, A.T., Remer, D.A. and Reynolds, L.P., 1993. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology.* 133: 1871-1879.
- JANSON, P.O., 1975. Effects of luteinizing hormone on blood in the follicular rabbit ovary as measured by radioactive microspheres. *Acta Endocrinology.* 79: 122-123.
- JEONG, K.H. and Kaiser, U.B., 2006. Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin biosynthesis and secretion. In: *The physiology of reproduction*, Volume 1. J.D. Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 1635-1704.
- JUENGEL, J.L. and Niswender, G.D., 1999. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl.): 193-205.
- KARETA, W., Korman, K., and Cegła, M., 2006. Ovulation level and prolificacy in ewes depending on their age, birth type and percentage of prolific genotype. *Reprod. Biol.* 2 (Suppl.): 73-78.
- KASSEM, R., Owen, J.B. and Fadel. I., 1989. The effect of pre-mating nutrition and exposure to the presence of rams on the onset of puberty in Awassi ewe lambs under semi-arid conditions. *Anim. Prod.*, 48: 393-397.
- KEISLER, D.H. 2007. Sheep breeding strategies. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, 2nd Edition. R.S. Youngquist and W.R. Threlfall (Eds.). WB Saunders Co., Pennsylvania. Pp. 649-661.
- KENJI, I., Kobayashi, N., Kohno, H., Miyamoto, A. and Hukui, Y., 2004. A Comparative Study of Induction of Estrus and Ovulation by Three Different Intravaginal Devices in Ewes during the Non-Breeding Season. *J. Reprod. Dev.*, 50: 63-69.
- KILEN, S.M. and Schwartz, N.B., 1998. Estrous cycle. In: *Encyclopedia of Reproduction*. E. Knobil and J.D. Neill

- (Eds). Volume 2, Academic Press, USA. Pp. 127-136.
- KILLIAN, D.B., Kiesling, D.O. and Warren, J.E.Jr., 1985. Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anestrus ewes. *J. Anim. Sci.* 61: 210-215.
- KNICKERBOCKER, J.J., Wiltbank M.C., and Niswender, G.D., 1988. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Dom. Anim. Endocrinol.* 5: 91-107.
- KNIGHT, T.W. and Lynch, P.R., 1980. Source of ram pheromones that stimulate ovulation in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 3: 133-136.
- KNIGHT, T.W., Tervit, H.R. and Lynch, P.R., 1983. Effects of boar pheromones, ram's wool and presence of bucks on ovarian activity in anovular ewes early in the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.*, 6: 129-134.
- KNIGHT, P.G. and Glister, C., 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary-Review. *Reproduction.* 121: 503-512.
- LAHLOU-KASSI, A. and Mariana, J.C. 1984. Ovarian follicular growth during the oestrous cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate, the D'Man and the Timahdite. *J. Reprod. Fertil.* 72: 301-310.
- LANGFORD, G.A., Marcus, G.J. and Batra, T.R., 1983. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. *J. Anim. Sci.* 57:307-312
- LEYVA, V., Buckrell, B.C. and Walton, J.S., 1998. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology.* 50: 395-416.
- LIGHT, J.E., Silvia, W.J. and Reid, R.C. 1994. Luteolytic effect of prostaglandin F2 alpha and two metabolites in ewes. *J. Anim. Sci.* 72: 2718-2721.
- LINDSAY, D., Martin, G. and Williams, I., 1993. Nutrition and reproduction. In: *Reproduction in Domesticated Animals. World Animal Science.* G. King, (Ed.). Elsevier Publishers, B.V., Amsterdam, Pp. 459-491.
- LINDSAY, D.R., 1996. Environment and reproductive behaviour. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 1-12.
- LOBB, D.K. and Dorrington, J., 1992. Intraovarian regulation of follicular development. *Anim. Rep. Sci.* 28: 343-354.
- LÓPEZ SEBASTIÁN, A., Alonso de Miguel, M., y Gómez Brunet, A., 1985. Características del comienzo de la pubertad en corderas Manchegas mediante la estimulación por machos en estación desfavorable. *Anales INIA*, 22: 167-181
- LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., 1991. Descarga preovulatoria de LH en ovejas con celo inducido mediante progestágenos y PMSG. *Invest. Agr.* 6: 123-131.

- LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend E.C. and Inskeep, E.K., 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 279-291.
- LUCIDI, P., Barboni, B. and Mattioli, M., 2001. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, 55: 1797-1805.
- LUNSTRA, D.D. and Christenson, R.K., 1981. Fertilization and embryonic survival in ewes synchronized with exogenous hormones during the anestrous and estrous seasons. *J. Anim. Sci.* 53: 458-466.
- LUCY, M.C., Savio, J.D., Badinga, L., De la Sota, R.L. and Thatcher, W.W., 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 3615-3626.
- MANDIKI, S.N., Noel, B., Bister, J.L. and Peeters, R., Beerlandt, G., Decuypere, E., Visscher, A., Suess, R., Kaulfuss, K.H. and Paquay, R., 2000. Pre-ovulatory follicular characteristics and ovulation rates in different breed crosses, carriers or non-carriers of the Booroola or Cambridge fecundity gene. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 77-88.
- MARSHALL, F.H.A., 1904. The oestrous cycle and the formation of the corpus luteum in the sheep. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 196: 47-97.
- MARTIN, G.B., Oldham, C.M., Cognie, Y., and Pearce, D.T., 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams—a review. *Livestock Prod. Sci.*, 15: 219-247.
- MARTIN, G.B., Price, C.A., Thiery, J.C. and Webb, R., 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 82: 319-328.
- MARTIN, G.B., Milton, J.T., Davidson, R.H., Banchero-Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R. and Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants-review. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-245.
- MAULEÓN, P., 1978. Ovarian development in young mammals. In: *Control of Ovulation*. Crighton, D.B., Haynes, N.B., Foxcroft, G.R. y Lamming, G.E. (Eds). Butterworths, Londres. Pp. 141-158.
- McCRACKEN, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Gréen, K. and Samuelsson, B. 1972. Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat. New Biol.* 238: 129-134.
- McCRACKEN, J.A., Custer, E.E. and Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event-review. *Physiol. Rev.* 79: 263-323.

- McKINSZIE, F.F. and Terrill, C.E., 1937. Estrus, ovulation, and related phenomena in the ewe. *Mo. Agric. Exp. Sta. Res. Bull.* 264: 5-88.
- McNATTY, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Tisdall, D.J., and Braw-Tal, R., 1995. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and effect of fecundity genes. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl): 123-135.
- McNATTY, K.P., Heath, D.A., Lundy, T., Fidler, A.E., Quirke, L., O'Connell, A., Smith, P., Groome, N. and Tisdall, D.J., 1999. Control of early ovarian follicular development-Review. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl):3-16.
- McNEILLY, A.S., Picton, H.M., Campbell, B.K. and Baird, D.T., 1991. Gonadotrophic control of follicle growth in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 43: 177-186.
- MILLAR, R.P. 2005. GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod. Sci.* 88: 5-28.
- MONGET, P. and Monniaux, D., 1995. Growth factors and the control of folliculogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl.): 321-333.
- MONGET, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J.M., Mazerbourg, S., Pisselet, C. and Monniaux, D., 2002. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals-Review. *Domest Anim Endocrinol.* 23: 139-154.
- MONTGOMERY, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H. and McNatty, K.P., 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep-Review. *Reproduction.* 121: 843-52.
- MONNIAUX, D., Monget, P., Besnard, N., Huet, C. and Pisselet, C., 1997. Growth factor and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology.* 47: 3-12.
- MOOR, R.M., 1977. Sites of steroid production in ovine graafian follicles in culture. *J. Endocrinol.* 73: 143-150
- MURTAGH, J.J., Gray, D.R., Lindsay, D.R., Oldham, C.M., 1984. The influence of the "ram effect" in 10-11 month-old Merino ewes on their subsequent performance when introduced to rams again at 15 months of age. *Proc. Aust., Soc. Anim. Prod.*, 15: 490-493.
- NAVARRO, L., Ramírez, M. and Torres, A., 1986. Observaciones sobre algunos parámetros reproductivos de la oveja West African en la mesa de guanipa. *Zoot. Trop.* 4: 29-48.
- NAVARRO, L., y Torres, A., 1985. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas West African en la mesa de guanipa. *Zoot. Trop.* 2: 39-49.
- NISWENDER, G.D., Suter, D.E. and Sawyer, H.R., 1981. Factors regulating receptors for LH on ovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.* 30 (Suppl): 183-189.

- NISWENDER, G.D., Schwall, R.H., Fitz, T.A., Farin, C.E. and Sawyer, H.R., 1985. Regulation of luteal function in domestic ruminants. New concepts. *Recent Prog. Horm. Res.* 41: 101-151.
- NISWENDER, G.D. and Nett, T.M., 1994. Corpus luteum and its control in intraprimate species. In: *Physiology of Reproduction*, Volume I, E. Knobil and J.D. Neill (Eds.). Raven Press, Ltd., New York, pp. 781-816.
- ORTAVANT, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J. and Volland-Nail, P., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod- Review. *Aust. J. Biol. Sci.* 41: 69-85.
- PARR, E.L., 1974. Absence of neutral proteinase activity in rat ovarian follicle walls at ovulation. *Biol Reprod.* 11: 509-512.
- PADMANABHAN, V., Karsh, F.J. and Lee, J.S., 2002. Hypothalamic, pituitary and gonadal regulation of FSH. *Reproduction.* 59: 67-82.
- PEARCE, D.T. and Oldham, C.M., 1984. The ram effect, its mechanism and application to the management of sheep—Review. In: *Reproduction in Sheep*. Lindsay, D.R. and Pearce, D.T. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp 26-34.
- PEARCE, G.P., and Oldham, C.M., 1988. Importance of non-olfactory ram stimuli in mediating ram-induced ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 84: 333-339.
- PELLICER, A., Palumbo, A., De Cherney, A.H. and Naftolin, F., 1988. Blockage of ovulation by an angiotensin antagonist. *Science.* 240: 1660-1661.
- PERKINS, A. and Fitzgerald, J.A., 1994. Luteinizing hormone, testosterone, and behavioral response of male-orientated rams to estrous ewes and rams. *J. Anim. Sci.*, 72: 51-55.
- PHILLIPS, D.J. and de Krester, D.M., 1998. Follistatin: a multi-functional regulatory protein. *Front. Neuroendocrinol.* 19: 287-322.
- PICTON, H.M., Tsonis, C.G. and McNeilly, A.S., 1990. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J. Endocrinol.* 126: 297-307.
- PINEDA, M.H., 1989. Sistema reproductor de la hembra. En: *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. L.E. McDonald (Ed.). 4ta. Edición, Interamericana Mc Growth-Hill S.A. México D.F., México. Pp. 294-344.
- POPE, W. F. and Cárdenas, H., 2004. Sensitivity of sheep to exogenous prostaglandin F2 α early in the estrous cycle. *Small Rumin. Res.* 55: 245-248
- PRICE, C.A. and Webb, R., 1989. Ovarian responses to hCG treatment

- during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 86: 303-308.
- RAVINDRA, J.P., Rawlings, N.C., Evans, A.C. and Adams, G.P., 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 101: 501-509.
- REDMER, D.A. and Reynolds, L.P., 1996. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1: 182-192.
- REYNOLDS, L.P. and Redmer, D.A., 1999. Growth and development of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl.): 181-191.
- REYNOLDS, L.P., Killilea, S.D. and Redmer, D.A., 1992. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB Journal.* 6: 886-892.
- REYNOLDS, L.P., Killilea, S.D., Grazul-Bilska, A.T. and Redmer, D.A., 1994. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog. Growth Factor Res.* 5: 159-175.
- RHODES, L. and Nathanielsz, P.W., 1988. Comparison of a controlled internal drug release device containing progesterone with intravaginal medroxyprogesterone sponges for estrus synchronization in ewes. *Theriogenology.* 30: 831-836.
- RICHARDS, J.S., 1980. Maturation of ovarian follicles: Actions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60: 51-89.
- ROBERTS, E.M. and Hafez, E.S., 1969. Synchronization of estrus in cyclic merino ewes with vaginal sponges and pregnant mare serum. *Am. J. Vet. Res.* 30:207-210.
- ROBERTSON, D.M., 1992. Follistatin/activin-binding protein. *Trends Endocrinol. Metabol.* 3: 65-68.
- ROBINSON, T.J., 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature.* 206: 39-41.
- ROBINSON T.J., Quinlivan, T.D. and Baxter, C., 1968. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 17: 471-483.
- RODGERS, R.J., Stuchberry, J. and Findlay, J.K., 1989. Inhibin mRNAs in ovine and bovine ovarian follicle and corpora lutea throughout the estrous cycle and gestation. *Mol. Cell Endocrinol.* 62: 95-102.
- ROMEU, A. Molina, I. Tresguerres, J.A. Pla M. and Peinado, J.A., 1995. Effect of recombinant human luteinizing hormone versus human chorionic gonadotrophin: effects on ovulation, embryo quality and transport, steroid balance and implantation in rabbits. *Hum. Reprod.* 10: 1290-1296.

- ROSA, H.J.D. and Bryant, M.J., 2002. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Rumin. Res.*, 45: 1-16.
- ROSA, H.J.D., Juniper, D.T. and Bryant, M.J., 2000. The effect of exposure to oestrous ewes on rams' sexual behaviour, plasma testosterone concentration and ability to stimulate ovulation in seasonally anoestrous ewes. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 67: 293-305.
- ROWLAND, M. and Tozer, T.N., 1989. Clinical pharmacokinetics: concepts and application. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- RUBIANES, E., Beard, A., Dierschke, D.J., Bartlewski, P., Adams, G.P. and Rawlings, N.C., 1997. Endocrine and ultrasound evaluation of the response to induced ovulation at different stages of the luteal phase in cycling ewes. *Theriogenology*. 48: 1093-1104.
- RUBIANES, E., Menchaca, A. and Carbajal, B., 2003. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2alpha. *Anim. Reprod. Sci.* 78:47-55.
- SALDIVIA, C. M., Silva, O. A. y Vásquez, L. A., 1992. Sección del Ligamento Dorsal del Pene y Epididimectomía en la Preparación de Toros detectores de Celos. *Revista Científica F.C.V.-LUZ*. 2, 7-10.
- SANGHA, G.K., Sharma, R.K. and Guraya, S.S., 2002. Biology of corpus luteum in small ruminant. *Small Rumin. Res.* 43: 53-64.
- SANTIAGO-MORENO, J., Lopez-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., Gomez-Brunet, A. and Chemineau, P., 2000. Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*). *Reprod. Nutr. Dev.* 40: 421-430.
- SCARAMUZZI, R.J., Downing, J.A., Campbell, B.K., and Cognie, Y., 1988. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation-Review. *Aust. J. Biol. Sci.* 41:37-45.
- SCARAMUZZI, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M. and Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate-Review. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 339-354.
- SCHRICK, F.N., Surface, R.A., Pritchard, J.Y., Dailey, R.A., Townsend, E.C. and Inskeep, E.K., 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 49:1133-1140
- SEEBURG, P.H., Mason, A.J., Stewart, T.A. and Nikolics, K., 1987. The mammalian GnRH gene and its pivotal

- role in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.* 43: 69-98.
- SIGNORET, J.P., Fulkerson W.J. and Lindsay, D.R., 1982. Effectiveness of testosterone-treated wethers and ewes as teasers. *Appl. Anim. Ethol.* 9: 37-45.
- SIMONETTI, L., Blanco, M.R. and Gardón, J. C., 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. *Small Rumin. Res.* 38: 243-247.
- SKINNER, D.C. Harris, T.G. and Evans N.P., 2000. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol. Reprod.* 63: 1135-1142.
- SMITH, M.F., McIntush, E.W., Ricke, W.A., Kojima, F.N. and Smith, G.W., 1999. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function-Review. *J. Reprod. Fertil.* 54 (Suppl.): 367-381.
- SPETH, R.C., Daubert, D.L. and Grove, K.L., 1999. Angiotensin II: a reproductive hormone too?-Review. *Regul. Pept.* 79: 25-40.
- STEEL, R.G.D. and Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York, USA.
- STEFFAN J., Poissonet P. and Thibier M., 1982. Control of oestrus in ewe lambs and yearling ewes with medroxyprogesterone acetate and fluorogestone acetate. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 191-198.
- STELLFLUG, J.N., Weems, Y.S. and Weems, C.W., 1997. Clinical reproductive physiology of ewes. In: *Current therapy in large animal theriogenology*, Youngquist, R.S. (Ed.). W.B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania. Pp. 594-598.
- STOUFLER, R.L., 2006. Structure function Follicular steroidogenesis and its control. In: *The physiology of reproduction*, Volume 1. J.D., Neill (Ed.). Raven Press, Ltd., New York. Pp. 475-526.
- SUGIYAMA, T., Sacada, H., Masaki, J. and Yamashita, K., 1981. Unusual fatty acids with specific odor from mature male gota. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2655-2658.
- THATCHER, W.W., Meyer, M.D. and Danet-Desnoyers, G., 1995. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl.): 15-28.
- TORRES, J, Montes, R. y Loria, J., 1996. Sincronización de estro en cabras criolla usando dosis reducidas de prostaglandina F₂alfa. *Vet Méx.* 2: 133-136.
- TSAFRIRI, A. and Dekel, N., 1994. Molecular mechanisms in ovulation. In: *Molecular biology of female reproductive system*. F.K. Findlay

- (Ed.). Academic Press, Inc. California. Pp. 207-258.
- TSONIS, C.G., Baird, D.T. Campbell, B.K., Leask, R. and Scaramuzzi, R.J., 1988. The sheep CL secretes inhibin. *J. Endocrinol.* 116: R5-R3.
- TURNBULL, K.E., Braden, A.W.H. and Mattner, P.E., 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* 30: 229-241.
- TURNBULL, K.E., Mattner, P.E., George, J.M. and Scaramuzzi, R.J., 1978. The relation between pattern of ovarian follicle growth and ovulation rate in sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 31: 649-655.
- UNDERWOOD E.J., Shier F.L. and Davenport N., 1944. Studies of sheep husbandry in W.A.V. The breeding season in Merino, crossbred and British breed ewes in agricultural districts. *J. Agric. Western Austr.*, 2: 135-143.
- UNGERFELD, R. and Rubianes, E., 2002. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Rumin. Res.* 46: 63-66
- UNGERFELD, R., Suárez, G., Carbajal, B., Silva, L., Laca, M., Forsberg, M. and Rubianes, E., 2003. Medroxyprogesterone priming and response to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 60: 35-45.
- VIÑOLES, C. and Rubianes, E., 1998. Origin of the preovulatory follicle after induced luteolysis during the early luteal phase in ewes. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 429-431.
- VIÑOLES, C., Meikle, A., Forsberg, M., and Rubianes, E., 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*. 51: 1351-1361.
- VIÑOLES, C., 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Swedish.
- VIÑOLES, C., Forsberg, M., Martin, G.B., Cajarville, C., Repetto, J. and Meikle, A., 2005. Short term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction*. 129: 299-309.
- WALKER, S.K., Smith, D.H., Godfrey, B. and Seamark, R.F., 1989. Time of ovulation in the South Australian Merino ewe following synchronization of estrus. 1. Variation within and between flocks. *Theriogenology*. 31: 545-553
- WATHES, D.C. and Lamming, G.E., 1995. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 49 (Suppl.): 53-67.

- WEBB, R. and Engeland, B.G., 1982. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: associated changes in the follicular size, thecal and granulosa cell luteinizing hormone receptors, antral fluid steroids, and circulating hormones during the preovulatory period. *Endocrinol.* 110: 873-881.
- WEBB, R., Gosden, R.G., Telfer, E.E. and Moor, R.M., 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci.* 68: 257-284.
- WEBB, R., Nicholas, B., Gong, J.G., Campbell, B.K., Gutierrez, C.G., Garverick, H.A. and Armstrong, D.G., 2003. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle-Review. *Reprod.* 61 (Suppl.): 71-90.
- WEEMS, C.W., Weems, Y.S. and Randel, R.D., 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals-Review. *Vet. J.*, 171: 206-28.
- WILTBANK, M.C. and Niswender, G.D., 1992. Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 103-110.
- YAVAS, Y. and Walton, J.S., 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology*, 54: 25-55.
- YILDIZ S., Saatci M., Uzun M. and Guven B., 2003. Effects of Ram Introduction After the Second Prostaglandin F2 α Injection on Day 11 on the LH Surge Characteristics in Fat-Tailed Ewes. *Reprod. Domest. Anim.*, 38: 54-57.
- YING, S.Y., 1988. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone-Review. *Endocr. Rev.* 9: 267-293.
- ZARCO, L., Rodríguez, E.F., Angulo, M.R.B. and Valencia, J., 1995. Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, 39: 251-258
- ZUCKERMAN, S. and Baker, T.G., 1977. The development of the ovary and the process of oogenesis. In: Zukerman, S. and Weir, B.J. (Eds). *The Ovary*. Volume 1. Academic Press, New York. Pp. 61-67.

9. ANEXOS

9.1 Anexo I (Material y Métodos)

9.1.1. Detección de Celos

En la primera parte de la fase experimental (Objetivo 1), la sintomatología del celo fue detectada cada 12 horas empleando un morueco epididimiectomizado (Saldivia et al., 1984), provisto con arnés marcador. En el resto de los experimentos, las detecciones de celos fueron llevadas a cabo mediante inspección visual directa usando moruecos entrenados, cada 4 horas a partir de las 24 horas posteriores al tratamiento. En la segunda fase experimental (Objetivo 2), específicamente en el Experimento 2, donde se evaluó la respuesta de sincronización del celo de la dosis alta, media y baja, la detección de celo se prolongó desde las 24 hasta las 80 horas postratamiento, con la finalidad de determinar la duración del celo.

9.1.2. Evaluación de los Folículos y Cuerpos Lúteos

La evaluación de los folículos y CLs fue realizada mediante un ecógrafo en modo B (Aloka SSD 500, Meditron, C.A., Venezuela), provisto de un transductor lineal de 7,5 MHz diseñado para la evaluación de próstata en humanos. Las observaciones fueron llevadas a cabo fijando la oveja en una camilla metálica, en posición de decúbito dorsal. Las heces fueron removidas manualmente del recto y posteriormente se aplicó un gel hidrosoluble, con la finalidad de evitar daños a nivel de la mucosa rectal y mejorar la transmisión de la imagen ecográfica. Seguidamente, la sonda fue colocada dentro de la ampolla rectal, orientando el transductor perpendicularmente hacia la pared abdominal. Los folículos fueron identificados como estructuras anecoicas y su medición fue realizada colocando los calibradores electrónicos en el límite ubicado entre la pared folicular y el estroma ovárico. Los CLs fueron identificados como estructuras hipoecoicas y homogéneas; sus diámetros mayor y menor fueron determinados colocando, en forma perpendicular, los calibradores electrónicos del ecógrafo en la interfase ubicada entre el tejido luteal y el estroma ovárico (Schrick et al., 1993; Contreras-Solís et al., 2007ab; ver Anexo V).

9.1.3. Análisis Hormonal

Las muestras de sangre fueron recogidas de la vena yugular, usando tubos con anticoagulante (EDTA y/o heparina sódica; Vacutainer®, Becton Dickinson, New Jersey, USA). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 *g* durante 15 minutos, y el plasma fue extraído y almacenado a -20°C hasta el momento del análisis.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de P₄ se realizó mediante radioinmunoanálisis usando kits en fase sólida (Count-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Caracas, Venezuela; Díaz, 1991). La sensibilidad del análisis y el coeficiente de variación intraensayo en el Objetivo 1 fueron 0,3 ng/ml y 3,1 %, respectivamente. En los análisis realizados durante el Objetivo 2, la sensibilidad y los coeficientes de variación intra e interensayos fueron 0,1 ng/ml, 4,8 y 10,0 %, respectivamente; y para el Objetivo 3 fueron de 0,1 ng/ml, 5,0 y 6,3 %, respectivamente. La presencia de un cuerpo lúteo activo fue definida cuando las concentraciones plasmáticas de P₄ fueron iguales o superiores a 0,5 ng/mL.

Las concentraciones plasmáticas de estradiol fueron determinadas usando un kit de radioinmunoensayo (Spectria®, Orion Diagnostic Corp., Espoo, Finland), según la metodología descrita por Romeo et al. (1995) y adaptada para su uso en plasma ovino por Gonzalez-Bulnes et al. (2003). La sensibilidad de la prueba fue de 5 pg/mL y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 5,0 y 9,7 %, respectivamente.

Las concentraciones de LH fueron determinados usando un kit de ELISA (LH Detect®, INRA, Tours, Francia), cuya sensibilidad fue de 0,01 ng/mL. Para los Objetivos 2 y 3, los coeficientes de variación intra-ensayo fueron de 5,0 y 3,4 % y los del inter-ensayo fueron 6,4 y 9,6 %, respectivamente.

9.1.4. Análisis Estadístico

Previamente al análisis estadístico de los resultados obtenidos, se calculó el área de los CLs fue usando la formula geométrica $\pi \times r^2$, eliminando la superficie de la cavidad central en aquellos CLs que la presentaban.

Para la descripción de las ondas de desarrollo folicular, los datos se organizaron en base a los siguientes conceptos: a) inicio de la onda (emergencia): día en que el folículo de mayor diámetro inicia su desarrollo o crecimiento; b) fase de crecimiento: definido como el lapso de tiempo en que el folículo de mayor diámetro alcanza su mayor diámetro o dominancia morfológica; c) fase de regresión: periodo de tiempo que se caracteriza por la disminución del diámetro del folículo, es decir desde el final de la fase de crecimiento, hasta que el folículo alcanza su menor diámetro; d) final de la

onda: momento en que el folículo alcanza su menor diámetro u ovula (en el caso de la última onda; Bartlewsky et al., 1999b; Evans et al., 2000).

En relación a las características de la onda preovulatoria de LH, el inicio y final de esta fueron definidos como el valor anterior y posterior, respectivamente, al incremento en un 10%, de las concentraciones basales de LH. Las concentraciones basales de LH, fueron determinados calculando el promedio de las concentraciones de LH antes y después del pico preovulatorio de LH. La duración del pico de LH fue definida como la diferencia entre el inicio y el final de la onda preovulatoria. El área bajo la curva (AUC), fue calculado usando el método del paralelepípedo descrito por Rowland y Tozer (1989).

Los datos ecográficos obtenidos en el Objetivo 1, fueron organizados para caracterizar los patrones de cada onda de crecimiento folicular y sus efectos sobre la población folicular, durante el intervalo interovulatorio; así como el efecto de la presencia o ausencia del CL sobre el número de folículos por ovario. Posteriormente, fueron valorados usando un análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía. Asimismo, se llevó a cabo una correlación de Pearson, para determinar la asociación entre el diámetro y el área (con o sin cavidad) del CL y los niveles de P_4 en plasma.

Los datos obtenidos en los Objetivos 2 y 3, fueron organizados para evaluar el efecto de las diferentes dosis sobre el estatus folicular y luteal (obtenidos por ecografía y análisis hormonales), así como el inicio y duración de los signos de celo y la onda preovulatoria de LH. Los efectos de los tratamientos sobre las variables consideradas fueron evaluados por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía. Para valorar las relaciones entre el inicio del celo y el inicio y momento del pico de LH, se usó una correlación de Pearson.

Todos los análisis, fueron realizados usando el programa estadístico Statgraphics plus (versión 5,1). Las diferencias fueron establecidas usando un nivel de confianza menor al 5% ($P < 0,05$; Steel y Torrie, 1985).

9.2. Anexo II (Índice de Tablas)

Tabla 1. Día de inicio, duración y tamaño del folículo de mayor diámetro (Media \pm EE) durante la etapa inicial (Onda 1) intermedia (Onda 2) y tardía (Onda 3) de la fase luteal del ciclo estral en ovejas de pelo. (Pág 26)

Tabla 2. Efecto de la presencia o ausencia del CL sobre el número de folículos/ovario/ciclo y de folículos/ovario/día (Media \pm EE), entre los días 3 y -2 del ciclo. (Pág 28)

Tabla 3. Porcentajes de celos, intervalo tratamiento-celo y duración del celo en ovejas WA tratadas con las dosis Alta/Comercial, Media y Baja de cloprostenol. (Pág 37)

Tabla 4. Características periovulatorias en ovejas WA tratadas con dosis alta (126 μ g) y baja ajustada (43,75 μ g) de cloprostenol. (Pág 38)

Tabla 5. Características periovulatorias en ovejas West African tratadas con cloprostenol en diferentes días del desarrollo luteal (Días 3, 5 y 7, después de la ovulación). (Pág 44)

Tabla 6. Efecto de la presencia o ausencia del “efecto macho” sobre las características periovulatorias en ovejas West African tratadas con un protocolo corto de sincronización del celo (dados 7 días a parte). (Pág 45)

9.3. Anexo III (Índice de Figuras)

Figura 1. Concentraciones de progesterona en plasma y área del cuerpo lúteo durante el ciclo el ciclo estral en ovejas West African. (Pág 25)

Figura 2. Numero total de folículos (Barras grises; ≥ 2 mm) y número de folículos pequeños (barras blancas; 2-3 mm) al inicio y al final de la fase de crecimiento del folículo dominante en ovejas con tres ondas de desarrollo folicular. (Pág 27)

Figure 3. Niveles plasmáticos de estradiol, alrededor del día del celo en: A- ovejas WA sincronizadas con la dosis alta, media y baja de cloprostenol. B- ovejas WA sincronizadas con la dosis alta y baja ajustada de cloprostenol. (Pág 36)

Figura 4. Niveles plasmáticos de estradiol, alrededor del día del celo (Día 0) en ovejas WA tratadas con una dosis de 43,75 μg de cloprostenol en los días 3, 5 y 7 (D3, D5 y D7) después de la ovulación. (Pág 43)

9.4. Anexo IV (Comunicaciones a Congresos)

Contreras, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Accuracy of ultrasonographic evaluation of presence and size of corpus luteum in monovular hair sheep. *IX Conference European Society for Domestic Animal Reproduction*, Murcia, España. 1 al 3 de Septiembre de 2005.

Contreras, I., Vásquez, B., Díaz, T., López, G., and Gonzalez-Bulnes, A. Effectiveness of low doses of cloprostenol for estrus induction in West African ewes (Venezuela). *X Conference European Society for Domestic Animal Reproduction*, Portoroz-Lipica, Eslovenia. 7 al 9 de Septiembre de 2006.

Contreras, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Systemic and intraovarian effects of the corpus luteum on follicular populations during the oestrous cycle of West African ewes. *8º Congreso Internacional Asociación Española de Reproducción Animal*, Murcia, España. 19 al 21 de Octubre de 2006.

Contreras, I., Vásquez, B., Díaz, T., López-Sebastian, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Efficacy of Low Doses of Cloprostenol for Synchronization of Oestrous and Ovulation in West African Ewes (Venezuela). *XI Conference European Society for Domestic Animal Reproduction*, Celle, Alemania. 19 al 23 de Septiembre de 2007.

Contreras-Solis, I., Vásquez, B., Díaz, T., López-Sebastian, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Synchronization of oestrus and ovulation in non-seasonal West African ewes treated with cloprostenol during early stages of luteal development. *16th International Congress on Animal Reproduction*, Budapest, Hungría, 13 al 17 de Julio de 2008-Aceptado.

Contreras-Solis, I., Vásquez, B., Díaz, T., López-Sebastian, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Improvement of synchronization of preovulatory LH surge and ovulation in tropical sheep treated with cloprostenol by the combination with "male effect". *XII Conference European Society for Domestic Animal Reproduction*, Utrecht, Netherlands, 20 al 23 de Noviembre de 2008-Aceptado.

Abstract P231

Accuracy of Ultrasonographic Evaluation of Presence and Size of Corpus Luteum in Monovular Hair Sheep

I Contreras¹, T Díaz¹, G López¹, A Caigua¹, H García¹, A Salvador¹ and A Gonzalez-Bulnes²

¹*Universidad Central de Venezuela, Venezuela,* ²*INIA, Spain*

Ultrasonographic evaluation of corpus luteum (CL) size is indicative of luteal function, in terms of progesterone secretion, in monovular ewes (Gonzalez-Bulnes et al., *Reprod. Dom. Anim.* 2000; 35: 65–68). The current study assessed the reliability of ultrasonographic measurements of luteal tissue in monovular hair ewes, by comparing ultrasonographic estimation of CL (presence and size) with subsequent macroscopic postmortem evaluations. Fifty two ovaries from hair sheep (n = 26) were used. Ultrasonographic observations of presence and size of CL were made using a 7.5 MHz transrectal probe, CL was measured by placing calipers at interface between luteal tissue and ovarian stroma. The ewes were slaughtered immediately and ovaries collected, fixed and dissected to measure the luteal tissue using a metallic caliper. Ultrasonographic and macroscopic data were compared on the follow score: 1) differences in diameter varying between 0 and 10%, 2) > 10 and 20%, 3) > 20 and 30% and 4) more than 30%. The predictive value and sensitivity of the ultrasound technique for detection of the presence of CL were 94.8% and 85.7%, respectively. The number of CL with differences between 0–10%, > 10–20%, > 20–30% and > 30%, were 8 (40%), 5(25%), 3 (15%) and 4(20%), respectively. It was concluded that ultrasound technique is effective for determining presence and size of CL, to provide a indirect evaluation of luteal function.* Project S1-2002000413.

Abstract P252

Effectiveness of Low Doses of Cloprostenol for Oestrus Induction in West African Ewes

I Contreras¹, B Vásquez², T Díaz¹, G López² and A Gonzalez-Bulnes³

¹Central University of Venezuela, ²INIA, Venezuela, ³INIA, Spain

The effectiveness of different doses of cloprostenol (Planate[®], Schering Plough) for oestrus synchronization was assessed in two consecutive experiments. In the first trial, ability to induce luteolysis was determined in 20 West African sheep treated with high (group H: 126 µg), medium (group M: 68.25 µg) and low (group L: 38.5 µg) doses of cloprostenol. Luteolysis, which was assessed by two ultrasonographies performed at the time of the cloprostenol administration and 3 days later, was 75.0% (6/8), 66.7% (4/6) and 83.3% (5/6) for H, M and L groups respectively. In a second experiment, 24 sheep were randomly assigned to the same three doses to evaluate a protocol of oestrus synchronization using two administrations 9 days apart. Cyclic activity was determined in all ewes by ultrasonographic scanning, on Days -9, -2, 0 (Day of second injection) and seven oestrus behaviour, detected every 4 h for 56 h, from 24 h after the second injection, was reported in 100% of H and L groups and 87.5% of M group. The start and length of oestrus to H, M and L groups were: 28.6 ± 1.8^a; 34.4 ± 1.0^{ab} and 37.1 ± 2.4^b h ($p < 0.05$); and 37.7 ± 4.4; 36.0 ± 2.8 and 36.0 ± 4.0 h, respectively. Ovulation rates were 1.4 ± 0.2; 1.4 ± 0.2 and 1.8 ± 0.3 for H, M and L groups respectively. Current study indicates that a low dose of cloprostenol is effective to induce luteolysis, oestrus and ovulation in West African hair ewes. (Funded by Fonacit S1-2002000413 and CDCH 11.31.4865/04).

P62

Systemic and Intraovarian Effects of the Corpus Luteum on Follicular Populations During the Oestrous Cycle of West African Ewes

I Contreras¹, T Díaz¹, G López², A Caigua¹ and A Gonzalez-Bulnes³

¹UCV, Venezuela, ²INIA-Lara, Venezuela, ³Dpto de Reproduccion Animal, INIA, Spain

Current study aimed to determine systemic and local effects of corpora lutea on follicular population in West African sheep. Fifteen cycles synchronized with prostaglandins were assessed, determining growth of follicles ≥ 2 mm by daily ultrasonography. Two of the cycles had two follicular waves, 10 had three and three had four waves. Dominant follicle was smaller in the second wave (3.9 ± 0.1 mm) than in the first and third waves (5.0 ± 0.2 and 5.7 ± 0.2 mm; $p < 0.0001$). Duration of the growth phase of the dominant follicle was shorter during the second wave (3.4 ± 0.3 days) than in the other waves (4.1 ± 0.2 and 6.3 ± 0.4 days for first and third follicular wave, respectively; $p < 0.0001$). Duration wave II was shorter than in wave I (5.7 ± 0.4 vs 6.9 ± 0.3 days; $p > 0.05$). The number of total and small follicles on the day that the dominant follicle was detected was less in wave II (T: 6.3 ± 0.9 ; S: 6.3 ± 1.0 ; $p < 0.01$) compared with wave I (T: 3.5 ± 0.7 ; S: 3.4 ± 0.8) and III (T: 2.5 ± 0.7 ; S: 2.3 ± 0.7). During the presence of a corpus luteum, the number of large follicles was lower in ovaries bearing CL (0.9 ± 0.5) compared to the contralateral ovary (2.7 ± 0.3 ; $p < 0.01$). Also, there was a trend for a decreased number of total follicles in these ovaries (32.4 ± 2.4 vs 42.2 ± 4.9 ; $p = 0.08$). These results provide evidence that corpus luteum exerts both systemic and local effects on the follicular population and influences follicular dominance throughout the oestrous cycle in hair (West African) sheep.

Abstract P242

Efficacy of Low Doses of Cloprostenol for Synchronisation of Oestrus and Ovulation in West African Ewes (Venezuela)

I Contreras-Solis¹, B Vasquez², T Diaz¹, A Lopez-Sebastian¹ and A Gonzalez-Bulnes³

¹*Universidad Central de Venezuela*; ²*INIA, Venezuela*; ³*INIA, Spain*

Twenty three West African ewes were treated with two cloprostenol doses (Planate®, Schering Plough), 9 days apart, to synchronize oestrus and ovulation. Half of the animals were treated with a commercial dose (C = 126 µg; n = 11) and the remaining with a reduced dose (LD = 43.75 µg; n = 12). Transrectal ultrasonography was used to evaluate luteolysis, (48 h after each cloprostenol injection), and timing of ovulation, every 4 h commencing 16 h after the start of oestrus, or every 4 h from 20 h after the second cloprostenol injection. Both commercial and low-doses of cloprostenol were effective to induce luteolysis in all sheep, at each administration. Oestrous activity was observed in 81.8 % and 83.3 % of C and LD groups, at 40.4 ± 1.4 and 35.6 ± 1.9 h, respectively ($p = 0.06$). Onset of ovulation was detected at 60.4 ± 2.4 vs 58.4 ± 2.8 h for C and LD, respectively; giving oestrus-ovulation intervals of 20.0 ± 1.6 in C and 22.8 ± 2.4 h in LD. The ovulation rate was also similar between groups (C: 1.7 ± 0.2 ; LD: 1.6 ± 0.2). This study indicates that lower doses of cloprostenol than commonly used are effective to induce luteolysis, oestrus and ovulation in hair sheep (*Funded by Fonacit S1-2002000413 and CDCH*).

Synchronization of oestrus and ovulation in non-seasonal West African ewes treated with cloprostenol during early stages of luteal development.

Contreras-Solis, I¹; Vasquez, B²; Díaz, T¹; Lopez-Sebastian, A³; Gonzalez-Bulnes, A³

¹*Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Venezuela*

²*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Venezuela*

³*Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Spain*

Cloprostenol (prostaglandin F2 alpha analogue) has been commonly used to synchronise oestrus in non-seasonal and seasonal ewes during the breeding season. The most usual protocol consist of two injections 9 to 11 days apart; however, the most recent studies indicate the possibility of increasing efficiency of the treatment by applying cloprostenol in early luteal phase (Contreras-Solis et al., in press). On the other hand, information about efficacy of cloprostenol injection during early stages of luteal development is controversial. Therefore, the aim of this study was to assess if a low dose of cloprostenol (43.75 µg; Planate®, Schering Plough) is capable to induce synchronization of oestrus and ovulation during the early stage of luteal growth in non-seasonal hair sheep. Twenty-four adult West African ewes were randomly assigned to three groups treated with cloprostenol at Day 3 (D3 n = 8), 5 (D5 n = 8) and 7 (D7 n = 8) after ovulation. Transrectal ultrasonographies were performed at Day 0 (day of injection), 1 and 10 to detect the presence of luteal tissue and luteolysis. Oestrous behaviour was detected every 4h from 20h after treatment using a trained teaser ram, whilst ovulation was detected by ultrasonographic scanning every 4 h from 16 h of the onset of oestrus. Assessment of luteal function was performed by determining plasma progesterone levels by radioimmunoassay. Seven out of eight ewes (87.5%) from D3 and D5 groups and all ewes from D7 group showed functional corpora lutea at timing of injection ($P < 0.001$; 1.4 ± 0.3 , 3.0 ± 0.4 and 3.9 ± 0.3 ng/mL of mean plasma progesterone concentration, respectively). Cloprostenol was effective to induce luteolysis and oestrus in all ewes. Oestrous activity was observed at 28.6 ± 3.3 , 34.3 ± 2.1 and 36.5 ± 3.2 h after treatment for D3, D5 and D7 groups, respectively. Onset of ovulation was detected at 51.4 ± 1.4 , 52.0 ± 1.8 and 55.0 ± 1.7 h for D3, D5 and D7, respectively; with oestrus-ovulation intervals of 22.9 ± 3.1 , 18.4 ± 2.7 and 18.5 ± 3.4 h. The number and function of corpora lutea were also similar among groups (D3: 1.9 ± 0.2 and 5.6 ± 0.5 ng/mL; D5: 1.7 ± 0.2 and 5.6 ± 0.4 ng/mL; D7: 1.4 ± 0.2 and 4.5 ± 0.7 ng/mL). Thus, current study indicates that cloprostenol is effective to induce luteolysis, oestrus, ovulation and corpora lutea with normal life span in hair sheep when is administered from Day 3 after ovulation. Funded by FONACIT S1-2002000413 and CDCH-UCV.

Contreras-Solis et al., Anim. Reprod. Sci. In press.

Improvement of synchronization of preovulatory LH surge and ovulation in tropical sheep treated with cloprostenol by the combination with male effect

I Contreras-Solís^{13*}, B Vásquez², T Díaz¹, A Lopez-Sebastian³ and A Gonzalez-Bulnes³.

*1 Universidad Central de Venezuela; 2 INIA, Venezuela; 3 INIA, Spain. *Candidate for doctoral degree*

Twenty West African ewes were treated (Venezuela, 10°N) with two injections of a low cloprostenol dose (43.75 µg; Planate®, Schering-Plough) at short interval (7 days), for synchronization of oestrus and ovulation. At the time of the second injection, nine animals were exposed to “ram effect”, after a previous isolation period of 4 weeks, (EM = 9), whereas the remaining acted as control without male exposure (CTR = 11). The timing of ovulation was assessed, by ultrasonography, every 4h from 20h-during 64h- after treatment. Plasma LH was analyzed from blood samples withdrawn coincidentally with the scanning. The preovulatory LH surge started earlier in EM group (35.0 ± 2.9 vs 44.0 ± 1.6 h; $P < 0.05$). Thereafter, although there were no differences in length and maximum concentration of the surge, the total LH released was lower than in CTR group (117.9 ± 7.8 vs 153.2 ± 13.0 ng/mL; $P < 0.05$). The onset of ovulation was also earlier in EM (100%; 49.5 ± 3.4 ; 32-56h) than in CTR group (63.6%; 61.1 ± 1.1 ; 52-64h $P < 0.001$). Hence, the incorporation of “ram effect” to protocols of oestrus synchronization with low doses, at short interval, of cloprostenol diminishes the time, and improves the synchronization, between the treatment and the preovulatory LH surge and subsequent ovulation. Funded by FONACIT and CDCH.

9.5. Anexo V (Publicaciones)

Contreras-Solís, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A., y Gonzalez-Bulnes, A., 2007. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección de folículos ováricos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 1: 10-14.

Contreras-Solís, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2007. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección y medición de cuerpos lúteos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 3: 114-118.

Contreras-Solís, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., López-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during oestrous cycle in hair breed sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 104: 47-55.

Contreras-Solis, I., Vásquez, B., Díaz, T., López-Sebastian, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Ovarian and endocrine response in tropical sheep treated with reduced doses of Cloprostenol. *Anim. Reprod. Sci.* En arbitraje

Contreras-Solis, I., Vásquez, B., Díaz, T., López-Sebastian, A. and Gonzalez-Bulnes, A. Efficiency of estrus synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. *Theriogenology.* En arbitraje.

Evaluación de la técnica de ecografía transrectal en la detección de folículos ováricos en ovejas tropicales

I. Contreras Solís^{*,†}, T. Díaz[‡], G. López[‡], A. Caigua[‡], H. García[‡],
A. Salvador[‡], A. González-Bulnes[‡]

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay

[‡]Departamento de Reproducción Animal, SGIT-INIA, Madrid, España.

Recibido Julio, 20, 2006. Aceptado Octubre 10, 2006.

Assessment of transrectal ultrasonography for detection of ovarian follicles in hair sheep

ABSTRACT: This study evaluated the accuracy of transrectal ultrasonography (US) for the determination of ovarian follicles in hair sheep. Number and size of follicles in 24 ovaries ($n=12$ ewes) were determined using an ultrasound machine (Aloka SSD 500), fitted with a 7.5 MHz transrectal probe. The ovaries were collected just after US, for measurement of the number and size of follicles (postmortem findings; PM). There were no differences in the number of small (2 to 2.9 mm), medium (3 to 3.9 mm), large (≥ 4 mm) and total follicles/ovary as detected by US and PM (1.3 ± 0.3 vs 1.6 ± 0.3 ; 0.5 ± 0.2 vs 0.8 ± 0.2 ; 0.5 ± 0.2 vs 0.5 ± 0.2 ; and 2.3 ± 0.3 vs 2.9 ± 0.4 ; respectively). The sensitivity and predictive value of US for detection of follicles in each category were 71.1, and 87%; 68.4, and 100%; 91.7, and 100%; 73.9, and 92.7%, respectively; the correlation coefficients (r) for number of small, medium, large, and total follicles being 0.75, 0.83, 0.96 and 0.75 ($P<0.001$), respectively. It was concluded that US is an efficient tool for detection and measurement of ovarian follicles in studies of the reproductive physiology in hair ewes.

Key word: Assessment, Ultrasonography, Ovarian follicles, Hair ewes.

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de la ecografía transrectal (US), en la detección de folículos ováricos en ovejas de pelo. Para ello el número y tamaño de los folículos procedentes de 24 ovarios ($n=12$ ovejas), fueron detectados empleando ecógrafo (Aloka SSD 500), provisto con un transductor transrectal de 7.5 MHz. Seguidamente, los ovarios fueron recolectados para la determinación macroscópica del número y tamaño de los folículos presentes (hallazgos postmortem; PM). Los resultados obtenidos demostraron que no hubo diferencias en el número de folículos pequeños (2 a 2.9 mm), medianos (3 a 3.9 mm), grandes (≥ 4 mm) y totales/ovario, evaluados tanto por US como por PM (1.3 ± 0.3 vs 1.6 ± 0.3 ; 0.5 ± 0.2 vs 0.8 ± 0.2 ; 0.5 ± 0.2 vs 0.5 ± 0.2 ; y 2.3 ± 0.3 vs 2.9 ± 0.4 ; respectivamente). La sensibilidad y el valor predictivo de la US para la detección de los folículos en cada una de las categorías, fueron de 71.1 y 87%; 68.4 y 100%; 91.7 y 100%; 73.9 y 92.7%, respectivamente. Los análisis de correlación (r) para el número de folículos pequeños, medianos, grandes y totales, detectados por US y PM fueron: 0.75, 0.83, 0.96 y 0.75 ($P<0.001$), respectivamente. Se concluye que la US es una herramienta eficaz para la detección y medición de folículos ováricos, la cual puede ser empleada para el estudio de la fisiología reproductiva de la oveja tropical.

Palabras clave: Evaluación, Ultrasonografía, Folículos ováricos, Ovejas de pelo.

Introducción

El folículo ovárico es la principal estructura encargada de la producción de gametos y de la secreción de esteroides en la hembra mamífera (Setchell, 1974; Kanchev et al., 1976; Spicer y Lichterkamp,

1985). Los trabajos llevados a cabo para evaluar su función, han sido realizados usando tanto técnicas indirectas (por determinación de las concentraciones de estradiol en plasma; Fortune et al., 1988), como

^{*}Autor para la correspondencia, e-mail: ignacio.contreras@ucv.ve

directas, siendo estas últimas realizadas, principalmente, por procedimientos invasivos tales como las histológicas (Hutchinson y Robertson, 1965), los quirúrgicos (laparotomía: Sosaen y Robertson, 1971) y por laparoscopia (Naeil *et al.*, 1993).

Desde inicio de los años 90, la ecografía ha tomado un gran auge como herramienta de elección, para el estudio de las estructuras ováricas en diferentes especies de animales domésticos (Griffin y Ginther, 1992). Su aplicación es altamente recomendada en pequeños rumiantes, debido al tamaño de estas y de sus estructuras genitales (Schröck *et al.*, 1993; Ginther y Kot, 1994; Lopez-Sebastian *et al.*, 1997). Asimismo, esta técnica posee la ventaja de permitir varias observaciones en un mismo animal, sin alterar su fisiología reproductiva, lo que permite su uso en estudios

reproductivos, donde es necesario efectuar varias mediciones a través del tiempo.

Existen varios estudios que evalúan la fiabilidad de la ecografía para la evaluación de folículos ováricos ovinos sin embargo, todos ellos han sido realizados en ovejas de lana (Schröck *et al.*, 1993; Gonzalez-De Pulgar *et al.*, 1994; Vinales *et al.*, 2004). Tal situación arroja la necesidad de comprender la fisiología ovárica en la oveja de pelo, a través del uso de dicha técnica, con la finalidad de optimizar las precisiones reproductivas de esta especie bajo condiciones tropicales. Por esta razón, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la eficiencia de la ecografía transrectal (UT) en la determinación de la presencia, número y tamaño de folículos en ovejas tropicales.

Materiales y Métodos

2.1. Animales y diseño experimental

Diece ovejas mestizas de la raza West African (destinadas a sacrificio), fueron usadas en el presente estudio, durante el mes de Mayo de 2004 (estación de lluvias). Las mismas provenían de un rebaño manejado bajo condiciones extensivas, en un hato localizado en el estado Apure, Venezuela (7° 45' N). Previamente al estudio, los animales fueron seleccionados por la gerencia del hato, para su sacrificio, por presentar una baja condición corporal entre 1.5 y 2 (escala de 0 a 3: Russel *et al.*, 1969) y, por no tener partes registradas después de las dos últimas temporadas de monta. A pesar de esta condición, los animales presentaron población folicular al momento de la evaluación ecográfica, no afectando el objetivo del presente estudio.

La evaluación ecográfica transrectal (UT), fue realizada usando un ecógrafo en modo B (Aluka 350 300, Medtison, C.A., Venezuela), provisto de un transductor lineal de 7.5 MHz, diseñado para la evaluación de próstata en humanos. Las observaciones fueron conducidas fijando la oveja en una camilla metálica, en posición decúbito dorsal. Las heces fueron removidas manualmente del recto y posteriormente un gel hidrosoluble fue introducida, con la finalidad de evitar daños a nivel de la mucosa rectal y mejorar la transmisión de la imagen ecográfica. Seguidamente, la sonda fue colocada dentro de la ampolla rectal, orientando el transductor perpendicularmente hacia la pared abdominal.

Los folículos, fueron identificados como estructuras anecoicas, cuando se compararon con el extremo ovárico (Schröck *et al.*, 1993). La medición de los folículos ($n = 24$ ovarios), fue realizada colocando

los calibreadores (calipers) electrónicos, en el límite ubicado entre la pared folicular y el extremo ovárico. Inmediatamente, las ovejas fueron sacrificadas y los ovarios recolectados, fijados y cortados en cortes de 1 mm de espesor, con la finalidad de obtener el mayor diámetro del folículo. Para la medición post-mortem (PM), se empleó un vernier (calibrador manual) con una precisión de 1 mm (Figura 1).

2.2. Análisis estadístico.

Los folículos detectados en cada ovario, por UT y PM, fueron agrupados según su diámetro en las siguientes categorías: pequeños (2 ± 2.9 mm), medianos (3 ± 3.9 mm), grandes (≥ 4 mm) y folículos totales (≥ 2 mm). La comparación de los datos obtenidos por ambos métodos, permitió establecer la fiabilidad de la UT (Cuadro 1) en términos de sensibilidad (porcentaje de folículos correctamente identificados: $a/(a+c) \times 100$ y el valor predictivo (número de folículos detectados ecográficamente/total de folículos hallados positivos por UT y aquellos diagnosticados como falsos positivos: $a/(a+b) \times 100$). La comparación del número de folículos (pequeños, medianos, grandes y totales: media \pm SEM) por ovario, detectados por ambos métodos, fue realizada usando un análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía (Chacin, 2000). La asociación entre el número de folículos (en cada categoría) detectados por UT y aquellos detectados por hallazgos PM, fue llevada a cabo usando un análisis de correlación de Pearson (Steel y Torrie, 1993). Se consideró un nivel de significancia de $P < 0.05$, para establecer las diferencias estadísticas. Los análisis estadísticos, se llevaron a cabo usando el programa estadístico Statgraphica plus (versión 5.1).

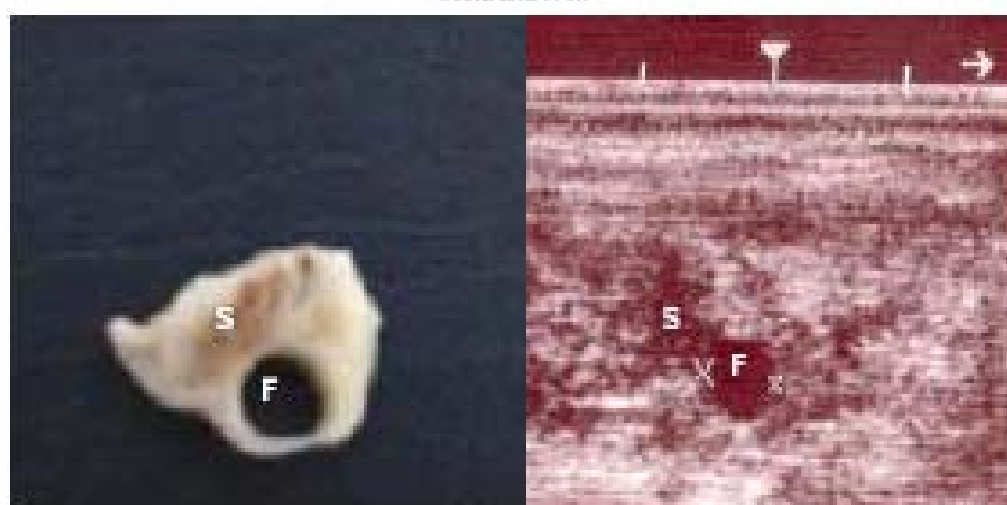


Figura 1. Derecha: Imagen ecográfica del ovario con un folículo 2-4mm (F); Izquierda: su imagen postmortem. Nótese parte del estroma ovárico (S).

Resultados y Discusión

En el presente estudio, no se encontraron diferencias entre el número de folículos pequeños ($1,29 \pm 0,3$ vs $1,58 \pm 0,3$), medianos ($0,54 \pm 0,2$ vs $0,79 \pm 0,2$), grandes ($0,46 \pm 0,2$ vs $0,50 \pm 0,2$) y totales ($2,3 \pm 0,3$ vs $2,9 \pm 0,4$) por ovario, detectados tanto por US como por hallazgos PM, respectivamente. Durante el estudio, hubo 5 y 4 animales, los cuales no se les detectaron folículos medianos tanto por US y por hallazgos PM, respectivamente; igualmente hubo la misma cantidad de ovejas los cuales no se les detectaron folículos grandes por ambos métodos. La proporción de los folículos pequeños, medianos y grandes fue: 55,1; 27,5 y 17,4%, respectivamente. Estos resultados fueron menores que los reportados por González-De Bulnes et al. (1994) en ovejas de lana con adecuada condición corporal ($4,1 \pm 0,4$). Probablemente, esta diferencia pueda ser debida a la baja condición corporal de los animales estudiados, producto de un bajo consumo de alimento (McNelly et al., 1987; Rhind y McNelly, 1998). No obstante, aunque el número de

los folículos en cada categoría (pequeños, medianos y grandes) fue inferior en estas ovejas (comparadas con las ovejas de lana), se puede inferir la presencia de una actividad de recambio folicular, lo que se evidenció en la proporción de folículos pequeños, medianos y grandes, lo cual fue similar a los respectivos valores obtenidos por Vitoles et al. (2004): 55, 24 y 21% y por González-De Bulnes et al. (1994): 56, 30 y 15%. Esta alta proporción de folículos pequeños y el bajo porcentaje de folículos medianos y grandes, igualmente coincidió con la población de folículos durante el ciclo estral, obtenidos en estudios donde se usó la US (López-Sebastián et al., 1997; Evans et al., 2000). Este hallazgo pudiera indicar que la actividad ovárica, en términos de recambio folicular dentro del ovario, persiste, a pesar de la baja condición corporal de los animales, tal como se ha reportado en vacas con balance energético negativo durante el postparto (Stagg et al., 1998).

La comparación entre los hallazgos por US y PM,

Cuadro 1. Tabla de contingencia (2×2) para la comparación de folículos detectados por ecografía transrectal (US) y por hallazgos postmortem (PM) en ovejas de pelo.

Resultados por US	Resultados por PM		Total
	Presencia	Ausencia	
Presencia	a	b	a + b
Ausencia	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

Cuadro 2. Sensibilidad, valor predictivo y correlación de los hallazgos ecográficos (US) comparados con los postmortem (PM) en la detección de felículos de diferentes tamaños.

	Tamaño (mm)			Total
	1 – 2.9	3 – 3.9	≥ 4	
Número. Felículos detectados por US	17	13	11	41
Número. Felículos detectados por PM	38	19	12	69
Sensibilidad	71.1	68.4	91.7	73.9
Valor predictivo	87.1	100	100	92.7
Correlación***	0.73	0.83	0.96	0.73

*** = p < 0.001.

refleje que la ecografía es una herramienta fiable para la evaluación de los felículos ováricos en aquellas ovejas con población felicular deprimida. En este sentido, la técnica ecográfica, permitió detectar el 73.9% de los felículos totales presentes en las ovarios. Asimismo, la eficiencia de la US, en términos de sensibilidad, aumentó a medida que se incrementó el diámetro del felículo (Cuadro 2); siendo similar a resultados previos de González-De Pulnes *et al.* (1994: 73.8%), pero menor a los Schrick *et al.* (1993: 93%).

En el presente estudio, las diferencias entre los felículos detectados por US y por observación directa (PM), fueron causadas por subestimación, lo cual coincide con la mayoría de los reportes en ovejas de lana (Schrick *et al.*, 1993; González-De Pulnes *et al.*, 1994), cabras (Simoes *et al.*, 2003) y vacas (Mc Deragall *et al.*, 1993). En cambio, en un estudio llevado a cabo por Vinales *et al.* (2004) en ovejas, los felículos detectados por US, fueron sobreestimados. Esto fue debido, a que los felículos detectados en una clase, pertenecieron a otra clase en el hallazgo PM, atribuyéndose este hecho a un error en la medición ecográfica.

A pesar que la ecografía tuvo un valor predictivo de un 100% para la detección de los felículos medianos, su sensibilidad fue menor a la observada para los felículos pequeños (68.4% vs 71.1%). Esta situa-

ción, probablemente fue debida, a una subestimación de los felículos de 3 mm, los cuales fueron considerados como felículos de 2 mm por US. Esto a su vez, es explicado por el valor predictivo obtenido en los felículos pequeños detectados por US (87.1%), lo que indica la incorporación de falsos positivos en los felículos que pertenecieron a esta categoría. Tal subestimación puede ser atribuida, al pequeño tamaño de estos felículos a la experiencia por parte del operador en el estudio realizado (Dickie *et al.*, 1999; Vinales *et al.*, 2004). Contrariamente a lo anteriormente expuesto, los parámetros de sensibilidad y de correlación entre los felículos observados por US y PM ≥ 4 mm, fueron altos en comparación a los felículos pequeños y medianos, lo cual coincide con lo señalado por Simoes *et al.* (2003). No obstante, los altos valores de eficiencia, en términos de sensibilidad y valor predictivo, obtenidos en el presente estudio, puede ser atribuido, a la baja condición corporal de los animales, lo cual se traduce en un menor número de felículos, facilitando de esta manera su detección.

Estos hallazgos nos permiten concluir que la ecografía es una técnica fiable, en la detección de felículos ováricos de ovejas tropicales y constituye una herramienta idónea para uso en estudios de fisiología ovárica en este tipo de ovejas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Yessaira Abraham, por su valiosa ayuda durante la realización del presente estudio. Igualmente, se agradece al FONACIT

(proyecto 51-2000000013) y al Progreso Ramón y Cajal, por el financiamiento del presente trabajo.

Literatura Citada

- Chacin, J. 2000. Diseño y análisis de experimentos. Ediciones del Vicerrectorado Académico de la Universidad Central de Venezuela. Maracay.
- Dickie, A. M., C. Paterson, J. L. M. Anderson and J. S. Boyd. 1999. Determination of corporal condition in free-living ewes using transrectal ultrasonography. Theriogenology, 51: 1209.

- Irwin, A. C., O. F. Duffy, N. Hyman, and M. F. Ireland. 2000. Waves of follicular development during the estrous cycle in sheep. *Theologonology* 32: 679.
- Jeetana, J. L., J. Kruis and S. M. Quirk. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theologonology* 20: 93.
- Garbar, O. J. and K. Nel. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theologonology* 22: 987.
- González De Pulgar, A., J. Santiago-Morales, M. García-López, A. Gómez-Sánchez, A. López-Sebastián. 1994. Observación del ovario en la ovula y atresia en la detección de folículos y cuerpo lúteo mediante ecografía transrectal. *Investigación Agrícola* 9 (3): 323.
- Gritter, T. G. and O. J. Garbar. 1992. Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci.* 75: 533.
- Hutchinson, J. S. and H. A. Robertson. 1966. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. *Res. Vet. Sci.* 7: 17.
- Kanchar, L. M., H. DeWise, W. R. Ward and R. J. Fitzpatrick. 1976. Concentration of steroids in bovine peripheral plasma during estrous cycle and the effect of oestrin ethylene treatment. *J. Reprod. Fert.* 48: 341.
- López-Sebastián, A., A. González de Pulgar, J. Santiago-Morales, A. Gómez-Sánchez, J. C. Tevendale and B. K. Inskeep. 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in a seasonal Merino del Taso ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 279.
- McDugal, S., C. R. Burke and K. L. MacMillan. 1999. Pattern of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Res. Vet. Sci.* 58: 214.
- McNelly, A. S., J. A. Jensen, and S. M. Rhind. 1987. Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta Veterinaria (Copenhagen)* 113: 73.
- Niel, K., J. L. Hirst and R. Jeetana. 1993. Ovarian follicular dynamics in follicle waves at different periods of the year. *J. Reprod. Fert.* 55: 699.
- Rhind, S. M. and A. S. McNelly. 1998. Effect of level of feed intake on ovarian follicle number, size and steroidogenic capacity in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 131.
- Russell, A. J., E. J. M. Denny and R. G. Cass. 1969. Subjective assessment of body fat in ewes. *J. Agric. Sci.* 72: 281.
- Schrick, F. M., R. A. Surfact, J. Y. Pritchard, R. A. Bailey, B. C. Tevendale and B. K. Inskeep. 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Vet. Reprod.* 47: 1133.
- Sethell, B. F. 1974. The contributions of Ragnier de Quatte reproductive biology. *Int. J. Obst. Gyna. Reprod. Biol.* 2: 1.
- Sin, H., J. J. Peter, J. Amador, J. C. Almeida, T. Santos, G. Teril and R. Macmillan. 2003. Morphology of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Friesian goats. *Anim. Reprod. Sci.* 83: 243.
- Sin, H., T. C. and H. A. Robertson. 1971. Studies on the growth and atresia of granular follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fert.* 23: 243.
- Spicer, L. J. and S. B. Robertson. 1983. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 62: 428.
- Stagg, K., M. G. Dunbar, J. M. Greenan and J. E. Roche. 1999. Follicular development in long-term anovulatory suckler beef cows fed two levels of energy supplementation. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 29.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1988. *Estadística: principios y procedimientos*. (2da Ed.). McGraw Hill México.
- Vizcarra, C., A. Melillo and M. Terschberg. 2004. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 69.

Evaluación de la ecografía transrectal para la detección y medición de cuerpos lúteos en ovejas de pelo

I. Contreras-Solis^{1*}, T. Díaz², G. López², A. Caigua², H. García²,
A. Salvador² y A. González-Bulnes²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay 2101,
Estado Aragua, Venezuela, POBox 4563.

²Departamento de Reproducción Animal, SGIT-INIA s/n, Madrid 28040, España.

Recibido Octubre 1, 2006. Aceptado Enero 21, 2007.

Accuracy of transrectal ultrasonography for evaluation of corpora lutea in hair sheep

ABSTRACT. Current study assessed the reliability of transrectal ultrasonography (US; Aloka SSD 500) for measurement of presence and size of corpus luteum (CL), evaluated by non-skilled operator in ovaries (n = 58) from 29 hair sheep and compared with subsequent macroscopic (or postmortem; PM) evaluation. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive value of the US technique to detect presence of luteal tissue in an ovary were 83.3, 97.1, 95.2 and 89.2%, respectively; and to determine the number of CL in ovaries (n = 21) with single ovulation were 83.7, 97.1, 94.7 and 89.2%, respectively. Sensitivity, dropped to 33.3%, in ovaries (n = 3) bearing more than one CL. There were no significant differences between mean diameters of CL, measured by US and PM. The number of CL with differences between US and PM measures, the range of error, varying between 0-20%, >20-30% and >30%, were 14 (77%), 2 (6%) and 4 (17%), respectively. These results indicate that US technique is an effective tool for determining both presence and size of luteal tissue in hair sheep with unknown stage of the reproductive cycle.

Keywords: transrectal ultrasonography, corpus luteum, measurement, hair-sheep

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de la técnica ecográfica transrectal (US), para la detección y medición de los cuerpos lúteos (CLs), en ovejas de pelo. Para ello, se estudiaron 58 ovarios (n = 29 ovejas), usando un ecógrafo (Aloka SSD 500) provisto de un transductor transrectal de 7.5 MHz. Seguidamente, los animales fueron sacrificados y los ovarios recolectados y fijados, para posteriormente determinar la presencia y el diámetro de los CL (hallazgos postmortem; PM). La detección ecográfica del tejido luteal en cada ovario, tuvo una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, de 83.3, 97.1, 95.2 y 89.2%, respectivamente. Asimismo, la determinación ecográfica de aquellos ovarios que presentaron una ovulación (n = 21), tuvo una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos, de 83.7, 97.1, 94.7 y 89.2%, respectivamente. Sin embargo, la sensibilidad de la US descendió a un 33.3% en aquellos ovarios (n = 3) portadores de más de un CL. No hubo diferencias entre los diámetros de los CL obtenidos tanto por US como por los hallazgos PM (9.5 ± 0.4 vs 8.8 ± 0.4 mm, respectivamente). El número de CL, con diferencias de diámetros, determinados por ambos métodos, y que presentaron los rangos de error entre 0-20%, >20-30% y >30%, fueron de 14 (77%), 2 (6%) y 4 (17%), respectivamente. Estos resultados indican que la US es una herramienta efectiva para la determinación de la presencia y diámetros del tejido luteal en ovejas tropicales sin conocimiento de las fases del ciclo estral.

Palabras clave: ecografía transrectal, cuerpos lúteos, medición, ovejas de pelo.

*Autor para la correspondencia, e-mail: ignacio.contreras@ucv.ve; Tel-Fax: +58 243 246 4266.

ISSN 1622-1391, 2007. Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Vol 15, número 3: 114-118

Introducción

La ecografía transrectal (US) se ha convertido en una herramienta importante para el conocimiento de las estructuras ováricas, tales como folículos y cuerpos lúteos (CLs), en las diferentes especies de hembras domésticas (Griffin and Ginther, 1992; Duggavathi *et al.*, 2003). Asimismo, en comparación con otras técnicas como la laparotomía, la US permite la visualización repetida y en tiempo real, de las estructuras corporales internas, minimizando de esta forma el manejo y el estrés de los animales. Esto último favorece su uso en el estudio de la dinámica de crecimiento folicular y luteal, en ovarios de ovejas y cabras (Schrick *et al.*, 1993; Ginther and Kot, 1994; Lopez-Sebastian *et al.*, 1997).

El CL es la principal estructura durante la fase luteal del ciclo estral de los mamíferos y el principal responsable del mantenimiento de la gestación en la mayoría de estas especies (Niswender and Nett, 1993). Su presencia o ausencia en el ovario, ha sido clínicamente detectada por métodos complejos e indirectos, tales como niveles de progesterona en fluidos corporales (ej. plasma), o por métodos invasivos como la laparotomía y laparoscopia. No obstante, la presencia de los CL también puede ser evaluada a través del uso de la US en tiempo real (Bardowski *et al.*, 1999; Gonzalez-Buñes *et al.*, 2000).

Los hallazgos obtenidos en estudios anteriores, no solamente han señalado la posibilidad que tiene la US para detectar el tejido luteal, sino también para determinar su función a través de la determinación de su tamaño. En este sentido, el tamaño del CL determinado por la US, está correlacionado positivamente con la secreción de progesterona (Gonzalez-Buñes *et al.*, 2000). No obstante, a pesar de que todos los estudios han sido llevados a cabo en ovejas de lana, la precisión de la US para la medición exacta del tejido luteal no ha sido establecida en ovejas de pelo, las cuales se caracterizan por su pequeño tamaño corporal, en relación a las razas de lana (Bruford y Fitzhugh, 1986). Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia del uso de la US (a través de los hallazgos PM), para la determinación de la presencia, número y tamaño del CL, en ovejas de pelo, ya que se hace necesario validar una técnica la cual pueda ser igualmente empleada en ovejas de pelo, para de esta manera ampliar y profundizar el conocimiento de su fisiología reproductiva.

Cabe mencionar, que durante la realización del presente trabajo, un estudio parecido fue publicado en ovejas de lana (Viñoles *et al.*, 2004); analizándose de esta forma, las similitudes y diferencias entre ambos estudios.

Materiales y Métodos

Animales y diseño experimental

La presencia y características de las estructuras luteales, fueron evaluadas en 29 ovejas de pelo con diferentes cruces (West African x Barbados Barriga Negra x Perra cabeza Negra). Este estudio fue llevado a cabo a lo largo de la estación de lluvias del 2004 (Mayo a Octubre), usando animales manejados bajo condiciones extensivas y procedentes de dos rebaños, ubicados en dos estados de Venezuela. Durante la evaluación US, las ovejas fueron colocadas y fijadas en decúbito dorsal, en una camilla de sujeción. El estudio US fue llevado a cabo usando un ecógrafo (Aloka 88D-500, Meditron, C.A., Venezuela) provisto con un transductor transrectal de 7.5 MHz, diseñado para la evaluación de la próstata humana. Previo a la evaluación US, las heces fueron removidas manualmente de la ampolla rectal y seguidamente fue administrado un gel hidrosoluble, con la finalidad de evitar daños en la mucosa rectal y mejorar la transmisión de las ondas emitidas por el transductor. Posteriormente, la sonda fue colocada dentro del recto con el transductor, perpendicularmente, orientado

hacia la pared abdominal. Los CLs, fueron identificados como estructuras hipocóicas y homogéneas, en relación con el estroma ovárico (Schrick *et al.*, 1993). La imagen ecográfica de cada CL, fue congelada cuando su mayor diámetro fue visualizado; asimismo, el diámetro fue determinado colocando los calibradores electrónicos del ecógrafo en la interfase ubicada entre el tejido luteal y el estroma ovárico. Seguidamente, las ovejas fueron humanitariamente sacrificadas y los ovarios fueron recolectados, fijados y cortados en rebanadas de un 1 mm de espesor, hasta obtener el mayor diámetro del tejido luteal, el cual fue obtenido usando un calibre metálico con una sensibilidad de 1 mm (Figura 1).

Análisis estadístico

La precisión de la US para la detección de la presencia del tejido luteal y de la tasa de ovulación por ovario, fue obtenida en base a los hallazgos PM. La evaluación de la US fue establecida empleando los términos de sensibilidad ($a/a + c$), especificidad ($b/b + d$) y valores predictivos positivo ($a/a + b$) y negativo ($c/c + d$; Cuadro 1).



Figura 1. Imágenes: ecográfica (superior) y macroscópica (inferior) de un cuerpo lúteo (CL) y del estroma (S) ovárico ovino.

Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson, entre los hallazgos por US y PM, en base a la presencia y número de CL. Las comparaciones entre los diámetros obtenidos por los hallazgos US y PM, fueron evaluados usando un análisis de la varianza de una sola vía (ANOVA). Los resultados fueron expresados como media \pm SEM y el establecimiento de sus diferencias, fueron consideradas estadísticamente significativas al $P < 0.05$. Asimismo,

se determinó el número de CLa cuyos diámetros (obtenidos por US y PM) presentaron los siguientes rangos de error: 1) entre 0 y 10%, 2) >10 y 20%, 3) >20 y 30% y 4) más de 30%. Finalmente, para evaluar la relación entre las medidas de los cuerpos lúteos realizadas por US y PM, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal. Los análisis estadísticos, se llevaron a cabo usando el programa estadístico Statgraphics plus (versión 5.1).

Resultados

Un total de 20 de 29 ovejas (68.9%), presentaron al menos un CL en el momento de la evaluación PM, sumando un total de 24 ovarios que portaron al menos un CL. Veintiuno de estos ovarios (87.5%) tuvieron un CL, y tres (12.5%) presentaron dos CLa. El

57.1% (12/21) y el 42.9% (9/21) de las ovulaciones ocurrieron en el ovario derecho e izquierdo respectivamente. No se detectaron cuerpos hemorrágicos ni de cavidades centrales en los CLa estudiados tanto por US como por PM.

Cuadro 1. Tabla de contingencia (2 x 2) para la comparación de estructuras lúteales detectadas por ecografía transrectal (US) y por hallazgos postmortem (PM) en ovejas de pelo.

Resultados por US	Resultados por PM		Total
	Presencia	Ausencia	
Presencia	a	b	a + b
Ausencia	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

Los resultados de sensibilidad y especificidad de la US, para la detección de la presencia de tejido luteal, alcanzaron 83.3 y 97.1 % ($r = 0.77$; $P < 0.001$), respectivamente; y los valores predictivos positivo y negativo fueron 95.2 y 89.2%, respectivamente. La sensibilidad y especificidad de la US para la identificación de aquellos ovarios con una sola ovulación, fueron 85.7 y 96.8% ($r = 0.84$; $P < 0.001$), respectivamente; y los valores predictivos positivo y negativo, fueron de 94.7 y 91.6%, respectivamente. Hubo pocos ovarios ($n = 3$) con más de un CL, obteniéndose una muy baja sensibilidad para la determinación del número de

CLs en aquellos ovarios con más de una ovulación (33.3%; 1/3).

No hubo diferencias estadísticas entre los diámetros promedio de los CLs, obtenidos por ambos métodos. Adicionalmente, los análisis de los rangos de error de los diámetros obtenidos por US y por PM, demostraron que el mismo no sobrepasó el 20%, en el 77% de los CLs estudiados (Cuadro 2). La ecuación obtenida del análisis de regresión lineal para evaluar la relación el diámetro (mm) obtenido por US y PM fue: $US = 4.7 + 0.5dPM$ ($P < 0.05$; $r^2 = 0.5$; $n = 18$).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio, confirman que la US es un método preciso para la detección de la presencia y tamaño de las estructuras luteales en ovejas de pelo con ovulaciones simples en cada ovario, ya que los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos fueron muy similares a los reportados en ovejas de lana y cabras (Viñoles *et al.*, 2004; Simoes *et al.*, 2005).

La falla en la detección de algunos CLs observada en el presente estudio, pudiera ser atribuida al hecho de que la mayoría de estas estructuras se ocurrieran en una fase luteal tardía (debido a que no hubo cuerpos hemorrágicos después de las observaciones PM). Esta circunstancia puede inducir a confusión de los patrones ecográficos del estroma ovárico y el tejido luteal en regresión; siendo estos errores reportados en estudios llevados a cabo tanto en ovejas de lana como en vacas (Harzen *et al.*, 2000; Veronesi *et al.*, 2002; Viñoles *et al.*, 2004). Asimismo, la presunción de que la mayoría de las ovejas estuvieran en una fase luteal tardía, pudiera ser reforzada por el hecho

que en el presente estudio, no se detectaron cavidades centrales en los CLs, siendo esto contrario a reportes previos en ovejas, donde se hallaron hasta un 30% de CLs con cavidad (Schrick *et al.*, 1993; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2000; Duggarathi *et al.*, 2002; Viñoles *et al.*, 2004). Las posibles causas de estas diferencias, pudieran atribuirse al hecho de que la mayoría, o sino todas las cavidades luteales, desaparecen durante de la fase luteal media y tardía (Bartlewski *et al.*, 1999).

La baja sensibilidad obtenida en relación a la determinación del número de CL, en ovarios con más de una ovulación, coincidió con estudios previos en los que se destaca la dificultad de diferenciar los CLs individuales de las masas de tejido luteal con más de un CL (Dickie *et al.*, 1999; Gonzalez-Bulnes *et al.*, 1999; Viñoles *et al.*, 2004).

Adicionalmente y en este sentido, la experiencia del operador pudiera haber afectado la eficiencia de la detección de estos CLs individuales durante la fase luteal tardía o en ovejas con agrupaciones de dos o

Cuadro 2. Diámetro promedio del tejido luteal obtenido tanto por ecografía transrectal (US) como hallazgos postmortem (PM), en ovarios que llevaron cuerpos lúteos ($n=18$), y número y proporción de cuerpos lúteos (CL) agrupados por porcentaje de error en las mediciones del diámetro del CL.

Hallazgos	Diámetro (mm; media \pm S.E.) ^a
US	9,5 \pm 0,4
PM	8,8 \pm 0,4
Diferencias porcentuales entre los diámetros obtenidos por US y PM	n (%)
0 - 10%	8 (44)
> 10 - 20%	6 (33)
> 20 - 30%	1 (6)
> 30%	3 (17)

más CLs en el mismo ovario (Ribadu et al., 1994; Simoes et al., 2008).

Según los resultados del presente estudio, el uso de la US ha probado ser una herramienta eficiente para la determinación del diámetro del CL. Asimismo, la exactitud del análisis de regresión resultó ser menor, pero cercana a la reportada por Vifoles et al. (2004); $r^2 = 0.4$, $n = 38$), siendo esto posiblemente atribuido al bajo número de los CLs medidos. Este hallazgo es muy importante para aquellos estudios que evalúan la función ovárica y luteal, ya que el tamaño del CL ha sido relacionado con la secreción de progesterona (Gonzalez-Bulnes et al., 2000). Asimismo la efectividad en la detección de las estructuras

luteales pudieran mejorar durante la mitad de la fase luteal, debido a que las imágenes ecográficas del estroma y del tejido luteal pueden ser mayormente diferenciadas que durante las fases tardías de la fase luteal (Hansen et al., 2000; Veronesi et al., 2002).

En conclusión, la US es un método rápido para la evaluación del estado funcional del CL, evitando el uso de métodos más complejos tales como la laparoscopia o los análisis hormonales. Asimismo, se demostró que la eficiencia de la US en la detección de aquellos ovarios con un solo CL, sin embargo, esta eficiencia disminuyó en aquellos ovarios que presentaron más de un CL.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el FONACIT (proyecto S1-2002000413) y por el Programa Ramón y Cajal. Los autores quieren expresar sus agradecimien-

tos a Yomaira Abraham por su ayuda durante la fase experimental del estudio.

Literatura Citada

- Bartlewski, P. M., A. P. Beard, and N. C. Rawlings, 1999. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology*, 52: 115.
- Dickie, A. M., C. Paterson, J. L. M. Anderson and J. S. Boyd, 1999. Determination of corpora lutea numbers in Bosonata-Tesol ewes using transrectal ultrasound. *Theriogenology*, 51: 1209.
- Duggavathi, R., P. M. Bartlewski, A. P. Pierson and N. C. Rawlings, 2001. Lutogenesis in cyclic ewes: echotexture, histological and functional correlates. *Biol. Reprod.*, 65: 634.
- Gnther, O. J. and K. Kot, 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, 42: 987.
- Gonzalez de Bulnes, A., E. Caceres and A. Lopez Sebastian, 1999. Ultrasonographic assessment of the ovarian response in eCG-treated goats. *Small Rumin. Res.*, 34: 63.
- Gonzalez de Bulnes, A., J. Santiago Morero, A. Gomez Brunet and A. Lopez Sebastian, 2003. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the estrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 45.
- Griffin, P. G. and O. J. Gnther, 1992. Research application of ultrasonic imaging in reproductive biology. *J. Anim. Sci.*, 75: 931.
- Hansen, C., M. Paines, O. Scarami and M. Drost, 2000. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *Veterinary Journal*, 159: 143.
- Lopez-Sebastian, A., A. Gonzalez de Bulnes, J. Santiago Morero, A. Gomez Brunet, E. C. Townsend and E. K. Inskeep, 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 279.
- Newsome, G. D. and T. M. Nett, 1993. Corpus luteum and its control in ruminant species. In: E. Knobil and J. D. Neill, (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. 1, Raven Press, New York.
- Ribadu, A. Y., W. R. Ward and H. Dobson, 1994. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. *Vet. Rec.*, 135: 452.
- Schrick, F. N., R. A. Squires, J. Y. Pritchard, R. A. Dailey, E. C. Townsend and E. K. Inskeep, 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, 49: 1131.
- Simoes J., J. Potes, J. Acevedo, J. C. Almeida, P. Fontes, G. Baril and R. Mascarenhas, R., 2005. Morphometry of ovarian structures by transrectal ultrasonography in Friesian goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 85: 261.
- Veronesi, M. C., G. Gabai, M. Battocchio, A. Meiko, F. Sokhano, G. Bono and F. Caloni, 2002. Ultrasonographic appearance of tissue is a better indicator of CL function than CL diameter measurement in dairy cows. *Theriogenology*, 58: 61.
- Vifoles C., A. Meikle and M. Forsberg, 2004. Accuracy of evaluation of ovarian structures by transrectal ultrasonography. *Anim. Reprod. Sci.*, 80 (1-2): 69.

Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep

I. Contreras-Solis^{a,c,*}, T. Diaz^a, G. Lopez^b, A. Caigua^a,
A. Lopez-Sebastian^c, A. Gonzalez-Bulnes^c

^a Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Central de Venezuela, Maracay 2101, Venezuela

^b INIA-Lara, Barquisimeto, Venezuela

^c INIA, Departamento de Reproducción Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Received 15 September 2006; accepted 29 January 2007

Available online 4 February 2007

Abstract

The present study aimed to determine systemic and local effects of corpora lutea (CL), on follicular dynamics throughout the estrous cycle. All follicles ≥ 2 mm and CL were assessed by daily transrectal ultrasonography in 12 West African ewes. Blood samples were collected to determine plasma concentration of progesterone. Fifteen estrous cycles were evaluated with a mean interovulatory interval of 16.8 ± 0.2 days. Two (13.3%), 10 (66.7%) and 3 (20%) of the estrous cycles had 2, 3 and 4 waves of follicular development, respectively. In sheep with three waves of follicular development, both the length of growing phase and the growth rate of dominant follicles from midluteal wave II were diminished (3.4 ± 0.3 days, $P < 0.0001$, and 0.4 ± 0.1 mm/day, $P < 0.01$, respectively) when compared to follicles from early luteal phase (wave I, 4.1 ± 0.2 days, and 0.7 ± 0.1 mm/day) or late luteal phase (wave III, 6.3 ± 0.4 mm and 0.6 ± 0.1 mm/day). The diameter of the dominant follicle was smaller during the midluteal phase (3.9 ± 0.1 mm, $P < 0.0001$) than in the early and late luteal phase (5.0 ± 0.2 and 5.7 ± 0.2 mm; respectively). The effect of the dominant follicle was less during midluteal phase, because number of accompanying smaller follicles was fewer ($P < 0.01$) in waves I and III (6.3 ± 0.9 compared with 3.4 ± 0.8 and 2.3 ± 0.7). The number of follicles was also different between ovaries that had CL and those that did not. The total number of large follicles during the luteal phase was less in ovaries with CL (0.9 ± 0.5 compared with 2.7 ± 0.3 ; $P < 0.01$), as was the mean daily number of both large (0.1 ± 0.02 compared with 0.2 ± 0.02 ; $P < 0.001$) and total number of follicles ≥ 2 mm (2.5 ± 0.1 compared with 3.3 ± 0.1 ; $P < 0.01$). Current results indicate that the presence

* Corresponding author. Present address: INIA, Departamento de Reproducción Animal, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +58 2432464266/+34 913474022, fax: +58 2432464266/+34 9134740014.

E-mail address: contreri@ucv.ve (I. Contreras-Solis).

of a functional CL may exert both systemic and local effects on the population of follicles, affecting the dominance exerted by large follicles.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ovarian follicular dynamics; Corpus luteum; Hair ewes

1. Introduction

The hair sheep is an important food source in many tropical areas of Latin America. Main advantages of hair breeds are their thriftiness and adaptation to tropical environment (Fitzhugh and Bradford, 1983), and the absence of seasonal anestrus (Navarro and Torres, 1985). The primary disadvantage of hair breed sheep is the lesser productivity, due to several factors such as lack of genetic selection, inadequate nutrition and limited reproductive management. Estrous behavior and ovulation in the sheep can be synchronized with intravaginal progestagen impregnated sponges (Robinson et al., 1967) or by exogenous prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) or its analogs (Boland et al., 1978; Greyling, 1996). PGF_{2α} can be used throughout the year for synchronizing estrus in hair breeds.

The response to PGF_{2α} is variable depending on the phase of the estrous cycle when administered (Rubianes et al., 2003). The differences in follicular response after luteolysis during early, mid and late luteal phases are assumed to be due to differences in endogenous progesterone (Gonzalez-Bulnes et al., 2005). Greater progesterone concentrations throughout the luteal phase of the estrous cycle induce lesser amounts of LH in blood, and LH is important for the final maturation of preovulatory follicles (Campbell et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2004). However, intraovarian effects of corpora lutea (CL), in a non-LH-dependent pathway (Tsonis et al., 1988; López-Sebastián et al., 1997; Fukuda et al., 1996; Bartlewski et al., 2001).

The first objective of the current study was to determine effects of the stage of the estrous cycle on patterns of ovarian follicular growth in hair sheep, which has not been previously described. The second objective was to assess intraovarian effects of CL on ovarian follicular development.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

Multiparous West African ewes ($n = 12$; around 2 years old; 30.5 ± 0.6 kg) were used during September and October, at the Instituto de Reproducción Animal (Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela, 10°N). They were maintained in pens (70 m²) and fed with 500 g/(ewe day) of concentrate (17% CP), allowing *ad libitum* access to hay (*Cynodon dactylon*) and fresh water.

Stage of the estrous cycle was synchronized using two i.m. injections of 10 mg prostaglandin F_{2α} (Lutalyse®, Pharmacia, Valencia, Venezuela), 10 days apart. Estrus was detected with a vasectomized ram fitted with a marking harness for detecting estrus and establishing the inter-estrus intervals.

2.2. Ovarian follicular and luteal development

Intraovarian effects of the CL were assessed in monovular estrous cycles. Each ewe was observed through one complete estrous cycle. Five ewes were observed through 2 complete

estrous cycles with a total of 15 monovular cycles analyzed. The number, position and diameter of all follicles ≥ 2 mm in size, and the position of CL were determined by transrectal daily ultrasonographies. Ultrasonographic assessments of ovarian structures were conducted by a single operator, using an Aloka 500 SSD (Meditron, Caracas, Venezuela) fitted with a 7.5 MHz linear array transducer (Schrick et al., 1993). The largest diameter of all ovarian follicles was measured and its position was recorded in a diagram of the ovaries to evaluate their development in successive observations.

For measurement of CL, the two largest diameters of each CL were obtained. Mean CL diameter was calculated from the average of both diameters and CL cross-sectional area was estimated by multiplying $\pi \times r^2$. The same procedure was used to measure the central CL cavity, by placing the callipers in the interface between the luteal tissue and the cavity; thereafter, the cavity area was calculated and subtracted from CL area to obtain the total area of luteal tissue.

2.3. Hormone assay

Jugular blood samples were collected, coincidentally with ultrasonographies, by using vacuum blood tubes with EDTA (Vacutainer® Systems, Becton Dickinson, USA). Plasma was separated by centrifugation at $1500 \times g$ for 15 min and stored at -20°C until assayed. Concentrations of progesterone were measured, in a single assay, using a solid-phase radioimmunoassay (DPC, Diagnostic Products Corporation, Caracas, Venezuela) with 0.3 ng/ml sensitivity and 3.1% intra-assay coefficient of variation.

2.4. Statistical analyses

Ultrasonographic data were summarized to characterize patterns of ovarian follicular development during the interovulatory interval. Because of variations between animals in the estrous cycle length, the beginning (Days 1–12) and end of the cycle (Days -4 to -0 ; estrus Day 0) were examined separately. First, all follicles present on the ovaries were classified by the largest diameter in four categories: total follicles (≥ 2 mm), small (2–3.4 mm), medium (3.5–4.4 mm) and large/ovulatory (≥ 4.5 mm). Follicular waves were characterized on the basis of Bartlewsky et al. (1999a) and Evans et al. (2000): (a) wave onset (emergence): day which follicles were first detected at 2 mm; (b) growth phase: defined as the time taken by a single follicle to grow from 2 mm to its maximum diameter; (c) regression phase (length): the time taken by a single follicle to regress from its maximum size until the day that it reach its smallest size; (d) the end of the wave: was defined as the day when the dominant follicle ending its regressing phase and/or ovulate (last wave). Effects of day of estrous cycle and wave of follicular development on number and size of follicles, on individual characteristics of follicles and CL and on progesterone concentrations throughout the study were assessed by ANOVA; the same for assessing both systemic and intra-ovarian effects of CL on follicular dynamics. Pearson correlation analyses were used to determine the correlation between CL diameter, luteal area and plasma progesterone levels. All results are expressed as mean \pm S.E.M. These data were analyzed using Statgraphics plus (versión 5.1).

3. Results

3.1. Characteristics of follicular development and CL during the estrous cycle

Monovular estrous cycles had a mean interovulatory interval of 16.8 ± 0.2 days. Ten of the estrous cycles (66.7%) had three main waves of ovarian follicular development, two estrous cycles

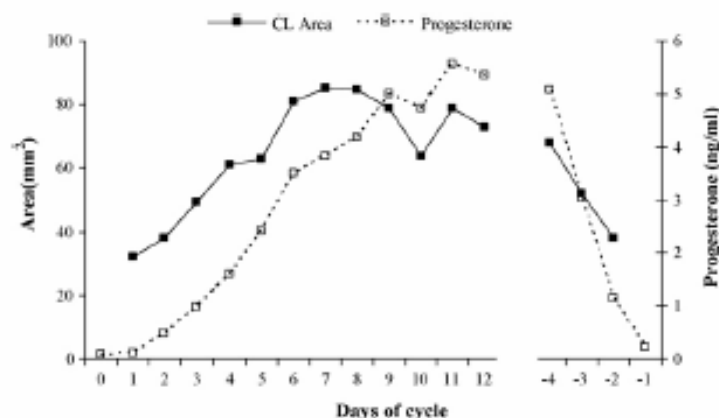


Fig. 1. Mean area of luteal tissue and mean plasma progesterone concentration during the estrous cycle of hair breed (West African) sheep.

(13.3%) had two waves and three estrous cycles (20%) had four follicular waves. The length of the estrous cycles with 2, 3 or 4 waves were 16.5 ± 0.5 , 16.9 ± 0.2 and 16.7 ± 0.4 days, respectively. The mean number of total follicles developing on each cycle assessed was 89.3 ± 6.9 (ranging from 58 to 144); a mean of 77.1 ± 5.6 follicles were classified as small (2–3 mm in size), 7.6 ± 0.6 were medium (4 mm) and 4.6 ± 0.6 were large follicles (≥ 5 mm).

Size of CL was larger ($P < 0.0001$) on Day 7 compared to Day 1 after ovulation but did not change in size from Day 7 to Day 11 (Fig. 1), and decreased thereafter. Plasma progesterone concentrations increased from Day 1 to Day 11 ($P < 0.0001$), so presence of functional luteal tissue (inducing progesterone concentrations ≥ 0.5 ng/ml) was present from Day 3 to Day –2 of estrous cycle. Progesterone concentrations are correlated with CL diameter and area ($r = 0.599$ and 0.565 , respectively; $P < 0.001$).

3.2. Interaction between follicular dynamics and stage of the estrous cycle (systemic effects of dominant follicles and CL)

The analysis of effects of the phase of the estrous cycle on follicular development was restricted to inter-ovulatory cycles with three follicular waves. Follicular development in each wave and the differences between waves are described in Table 1. The second wave of follicular development, during mid-luteal phase, was shorter than the first. However, the length between first and third waves of follicular development and second and third waves were similar, with duration of the second wave being shorter than the first. The length of the growing phase of the largest follicle tended ($P = 0.06$) to be shorter in the second wave of follicular development than in the first; and both first and second waves of follicular development had differences when compared with the third ($P < 0.0001$). The dominant follicles in the second wave of follicular development were smaller ($P < 0.0001$), with a slower rate of growth (0.4 ± 0.1 mm/day; $P < 0.01$) than that of the largest follicles from the first and third waves of follicular development (0.7 ± 0.1 and 0.6 ± 0.1 , respectively).

In the presence of a large follicle or dominant follicle, there were fewer ($P < 0.01$) numbers of small follicles in wave one and three compared to wave two (3.4 ± 0.8 and 2.3 ± 0.7 compared with 6.3 ± 1.0 follicles; Fig. 2). The mean number of smaller follicles decreased through the period of growth of dominant follicles during third wave of follicular development (from 5.2 ± 0.7

Table 1

Highlight of characteristics of ovarian follicular growth (mean \pm S.E.M.) during the early (Wave 1), mid- (Wave 2) and late luteal phase (Wave 3) of estrous cycle in hair breed (West African) sheep

	Wave 1	Wave 2	Wave 3
Wave onset (day of estrous cycle)	1.1 \pm 0.3 a	6.3 \pm 0.4 b	10.7 \pm 0.5 c
Major growth (day of estrous cycle)	4.3 \pm 0.3 a	8.6 \pm 0.5 b	16.0 \pm 0.2 c
Length of follicular growth (days)	4.1 \pm 0.2 a	3.4 \pm 0.3 a	6.3 \pm 0.4 b
Follicle diameter at onset of the wave (mm)	2.3 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1
Diameter of largest follicle (mm)	5.0 \pm 0.2 a	3.9 \pm 0.1 b	5.7 \pm 0.2 c
End of follicular wave (day of estrous cycle)	7.1 \pm 0.3 a	10.9 \pm 0.6 b	–
Follicle diameter at end of wave (mm)	2.7 \pm 0.3	2.4 \pm 0.1	–
Follicular regression length (days)	2.8 \pm 0.4	2.3 \pm 0.3	–
Follicular wave length (days)	6.9 \pm 0.3 d	5.7 \pm 0.4 e	6.3 \pm 0.4 de

Different letter indicate significant differences: a \neq b \neq c: $P < 0.0001$; d \neq e: $P < 0.05$.

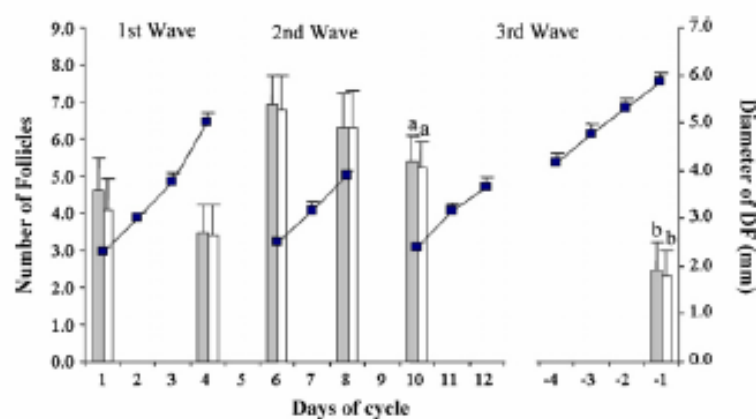


Fig. 2. Mean number of total (≥ 2 mm; grey bar) and small follicles (2–3 mm; white bar) and mean diameter of the largest follicle (continuous line) during the growing period of the different waves of follicular development of the estrous cycle in hair breed (West African) sheep. Superscripts indicate differences at $P < 0.05$.

to 2.3 ± 0.7 follicles; $P < 0.05$); however, this relationship was not observed in the first (from 4.1 ± 0.8 to 3.4 ± 0.8 follicles) and second wave (from 6.3 ± 0.9 to 6.3 ± 1.0 ; Fig. 2).

3.3. Intraovarian effects of the CL

There were no differences in the total number of small and medium follicles between the ovary containing the CL and the contralateral ovary; however, the number of large follicles/estrous cycle was less in ovaries containing the CL ($P < 0.01$; Table 2). When the number of follicles/ovary/day was analyzed during the same period, there were fewer total and large follicles ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) in ovaries bearing a CL.

4. Discussion

Ovarian follicular growth during the estrous cycle in hair sheep is characterized by the appearance of two to four waves of follicular development, with three waves being the most common pattern. Large ovarian follicles from every wave of follicular development are able to exert dom-

Table 2

Differences in mean number of ovarian follicles, classified by categories (\pm S.E.M.), between ovaries that had CL and those did not during the estrous cycle of a hair breed (West African) of sheep

Follicles (categories)	Ovary with CL	Ovary without CL	Both ovaries
Total number of follicles/cycle			
Small (2–3 mm)	28.9 \pm 2.3	36.1 \pm 4.6	64.3 \pm 5.2
Medium (4 mm)	3.1 \pm 0.6	3.4 \pm 0.5	6.4 \pm 0.7
Large (5 mm)	0.9 \pm 0.5 a	2.7 \pm 0.3 b	3.6 \pm 0.5
Total (\geq 2 mm)	32.4 \pm 2.4	42.2 \pm 4.9	74.4 \pm 5.1
Daily number of follicles/estrous cycle			
Small (2–3 mm)	2.2 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	5.0 \pm 0.2
Medium (4 mm)	0.2 \pm 0.04	0.3 \pm 0.04	0.5 \pm 0.04
Large (5 mm)	0.1 \pm 0.02 c	0.2 \pm 0.02 d	0.3 \pm 0.03
Total (\geq 2 mm) d	2.5 \pm 0.1 a	3.3 \pm 0.1 b	5.8 \pm 0.2

Different letters indicate significant differences: a \neq b: $P < 0.01$; c \neq d: $P < 0.001$.

inance effects over the remaining follicles due to secretion of estradiol, inhibin and follistatin; which suppress FSH secretion (Webb et al., 1999; Gonzalez-Bulnes et al., 2004). However, such effects are modulated by the stage of the estrous cycle (i.e., by the presence or absence of a fully active CL; Adams, 1999; Gonzalez-Bulnes et al., 2005). Corpora lutea affect ovarian follicular dynamics in both ovaries by a systemic effect with evidence for a local ipsilateral effect.

Patterns of ovarian follicular growth during the estrous cycle in hair sheep are similar to those reported in wool ewes (López-Sebastián et al., 1997; Bartlewsky et al., 1999a; Evans et al., 2000). These data reaffirm the existence of major waves with large follicles reaching dominance (during the early luteal phase and the follicular phase) and minor waves of follicular development without a clearly defined dominant follicle (during mid-luteal stages), as hypothesized by Adams (1999). Absence of a dominance effect during the luteal phase of the ovine estrous cycle may be due to the suppressive effects of progesterone from the CL (Adams, 1999). Similar to wool ewes (Bartlewsky et al., 1999a; Evans et al., 2000), there was a dominance effect from large follicles. In brief, the emergence of new and the development of small subordinate follicles were decreased by the presence of a dominant follicle, as reported in wool ewes (López-Sebastián et al., 1997; Gonzalez-Bulnes et al., 2001, 2004).

The ultrasonographic image and size of CL changed from ovulation to luteolysis in a similar manner to what has been described in other breeds (Bartlewsky et al., 1999b; Gonzalez-Bulnes et al., 2000). As expected, the cross-sectional area of the CL was correlated with day of estrous cycle and plasma progesterone concentrations. However, the CL and diameter of the dominant follicle were smaller in hair ewes than previously reported in wool sheep (Ravindra et al., 1994), which may be related to the small body size of West African sheep. Similar differences were found when comparing heavier and lighter weight European breeds (Gonzalez-Añover et al., 2007). Although there were differences in the size of ovarian structures, the similarity in the dynamics of growth of CL and follicles with other breeds of different origin and reared under different conditions support the hypothesis that breed, environmental conditions or artificial selection may influence seasonal reproductive activity but does not affect intrinsic ovarian activity during the estrous cycle. Similar results have been reported when comparing domestic and wild-sheep (Gonzalez-Bulnes et al., 2001) or different breed in domestic goats (Cueto et al., 2006).

Furthermore, in agreement with previous studies (Dufour et al., 1972; Rexroad and Casida, 1977) in other breeds, there was a relationship between the development of CL and the devel-

opment of follicles. In the current study, the length of the second wave of ovarian follicular development, during mid-luteal phase of the estrous cycle, was shorter; with a shorter growing phase for the largest follicle. Moreover, the growth of subordinate follicles was only inhibited by the largest follicle in the early or late luteal phase. These observations indicate an absence of dominance effects during the active phase of the CL, giving new evidence to support the hypothesis of Adams (1999) about the existence of suppressive effects of progesterone from the CL on lifespan of dominant follicles. It is well known that progesterone functions on follicle development by a systemic pathway, by diminishing the frequency of LH pulses. During the processes of selection and dominance of ovarian follicles, FSH secretion is decreased by inhibin and estradiol from dominant follicles. Follicular atresia does not occur in these follicles as a result of changed receptor populations from a predominance of FSH to LH receptors; but if LH receptor populations are also decreased due to the presence of a CL, the dominant follicle regresses and a new wave of follicular development is initiated (Campbell et al., 1999; Webb et al., 1999).

However, the most important finding in current study is the existence of not only a systemic, but also a possible intraovarian effect from the CL on follicular dynamics, with a greater decrease in the number of follicles growing to large sizes in the ovary ipsilateral to the CL (Bartlewski et al., 2001). This result, firstly reported in ruminants (cow: Thatcher et al., 1991) is similar to clinical findings in humans. In humans, dominant follicles that appear contralateral to the previous site from where ovulation occurred are healthier than ipsilateral follicles, leading to an enhanced pre-embryo quality in estrous cycles from which oocytes are obtained for IVF (Fukuda et al., 1996). These present results support the existence of local inhibitory factors released from the CL. A possible candidate is inhibin, which is secreted by the CL of goats and cattle (Sangha et al., 2002) and secreted into ovarian venous blood of ewes (Tsonis et al., 1988); and which is widely known to affect ovarian follicular growth (Campbell et al., 1991). Nevertheless, the existence of this peptide is unclear due to findings of Rodgers et al. (1989) due to the absence of the mRNA for α and β inhibin subunits in the luteal cell of mature ovine CL as well as in CL of pregnancy. To assess the factors implicated and the mechanism of action it is necessary to design specific experiments to assess how the CL is impacted ovarian follicular development.

Results from the current study provide evidence of both systemic and local inhibitory effects from CL on growth of preovulatory-sized follicles. It can, therefore, be hypothesized that follicular function may be compromised during the mid-luteal phase of the estrous cycle. Previous studies in goats have shown that ovulation from such follicles result in lesser fertility (Gonzalez-Bulnes et al., 2005). Thus, for estrous synchronization before mating or artificial insemination in hair sheep, the most desirable time for inducing luteolysis by prostaglandin treatments would be either during early or late luteal phase of the estrous cycle. Data from wool sheep indicate a greater number of females showing estrus behavior, an earlier appearance of such signs and a greater number of females having ovulations when treating early in the luteal phase (Acritopoulou and Haresign, 1980). Thus, a practical point of view would favor the application of treatments with a short interval between PGF $_{2\alpha}$ applications, early in the luteal phase, because the CL is more responsive to PGF $_{2\alpha}$ from Day 3 of the estrous cycle (Rubianes et al., 2003).

Acknowledgements

Critical revision of the manuscript by L. Harkness is gratefully acknowledged. Authors want to thanks to Pedro Cabrera, Francisco Cova and Antonio Orellana for their help during this study. Likewise, the authors thank to FONACIT (project S1-2002000413) for its financial support.

References

- Acritopoulou, S., Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 58, 219–221.
- Adams, G.P., 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 54), 17–32.
- Bartlewsky, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Chandolia, R.K., Honaramooz, A., Rawlings, N.C., 1999a. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.* 115, 111–124.
- Bartlewsky, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C., 1999b. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. *Theriogenology* 52, 115–130.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Rawlings, N.C., 2001. Ultrasonographic study of the effects of the corpus luteum on antral follicular development in unilaterally ovulating western white-faced ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 65 (3/4), 231–244.
- Boland, M.P., Gordon, I.R., Kellcher, D.L., 1978. The effect of treatment by prostaglandin analogue (ICI-80996) or progestagen (SC-9880) on ovulation and fertilization in cyclic ewes. *J. Agric. Sci. Camb.* 91, 727–730.
- Campbell, B.K., Picton, H.M., Mann, G.E., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 1991. Effect of steroid- and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fertil.* 93, 81–96.
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., Webb, R., 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl. 49), 335–350.
- Campbell, B.K., Dobson, H., Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J., 1999. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 117, 355–367.
- Cueto, M., Gibbons, A., Alberio, R., Taddeo, H., Gonzalez-Bulnes, A., 2006. Timing of emergence of ovulatory follicles in polyovulatory goats. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 275–284.
- Dufour, J., Ginther, O.J., Casida, L.E., 1972. Intraovarian relationship between corpora lutea and ovarian follicles in ewes. *Am. J. Vet. Res.* 33, 1145–1146.
- Evans, A.C.O., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., 2000. Waves of follicles development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699–715.
- Fitzhugh, H.A., Bradford, G.E., 1983. *Hair Sheep of Western Africa and the Americas: A Genetic Resource for the Tropics*. Westview Press, Boulder, CO.
- Fukuda, M., Fukuda, K., Yding, Andersen, C., Byskov, A.G., 1996. Contralateral selection of dominant follicles favours pre-embryo development. *Human Reprod.* 11, 1958–1962.
- Gonzalez-Añover, P., Encinas, T., Veiga-López, A., Ammoun, I., Contreras, I., Ros, J.M., Ariznavarreta, C., Tresquerres, J.A.F., Gonzalez-Bulnes, A., 2007. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 29–33.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Gomez-Brunet, A., Lopez-Sebastián, A., 2000. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod. Dom. Anim.* 35, 65–68.
- Gonzalez-Bulnes, A., Santiago-Moreno, J., Garcia-Garcia, R.M., del Campo, A., Gomez-Brunet, A., Lopez-Sebastian, A., 2001. Origin of the preovulatory follicle in Mouflon sheep (*Ovis gmelini musimon*) and effect on growth of remaining follicles during the follicular phase of oestrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 265–272.
- Gonzalez-Bulnes, A., Souza, C.J., Campbell, B.K., Baird, D.T., 2004. Systemic and intraovarian effects of dominant follicles on ovine follicular growth. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 107–119.
- Gonzalez-Bulnes, A., Diaz-Delfa, C., Garcia-Garcia, R.M., Urrutia, B., Carrizosa, J.A., Lopez-Sebastian, A., 2005. Origin and fate of preovulatory follicles after induced luteolysis at different stages of the luteal phase of the oestrous cycle in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 86, 237–245.
- Greyling, J.P.C., 1996. The effect of dose of prostaglandin in the synchronization of oestrus in the Boer goat doe. In: *Proceedings of the Sixth International Conference in Goats*, Beijing, China, p. 826 (abstract).
- López-Sebastián, A., González de Bulnes, A., Santiago Moreno, J., Gómez Brunet, A., Townsend, E.C., Inskip, E.K., 1997. Patterns of follicular development during the estrous cycle in monovular Merino del Pais ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 279–291.
- Navarro, L., Torres, A., 1985. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas West African en la mesa de guanipa. *Zoot. Trop.* 2, 39–49.
- Ravindra, J.P., Rawlings, N.C., Evans, A.C., Adams, G.P., 1994. Ultrasonographic study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 101, 501–509.
- Rexroad Jr., C.E., Casida, L.E., 1977. Effect of injection of progesterone into one ovary of PMSG-treated anestrous ewes on follicle growth and ovarian estradiol-17 beta. *J. Anim. Sci.* 44, 84–88.

- Robinson, T.J., Moore, N.W., Holst, P.J., Smith, J.F., 1967. The evaluation of several progestogens administered in intravaginal sponges for the synchronization of estrus in the entire cyclic Merino ewe. In: Robinson, T.J. (Ed.), *Control of the Ovarian Cycle in the Sheep*. White and Bull PTY Ltd., pp. 76–91.
- Rodgers, R.J., Stuchberry, J., Findlay, J.K., 1989. Inhibin mRNAs in ovine and bovine ovarian follicle and corpora lutea throughout the estrous cycle and gestation. *Mol. Cell Endocrinol.* 62, 95–102.
- Rubianes, E., Menchaca, A., Carvajal, B., 2003. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2alpha. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 47–55.
- Sangha, G.K., Sharma, R.K., Guraya, S.S., 2002. Biology of corpus luteum in small ruminant. *Small Rumin. Res.* 43, 53–64.
- Schrick, F.N., Surface, R.A., Pritchard, J.Y., Dailey, R.A., Townsend, E.C., Inskip, E.K., 1993. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* 49, 1133–1140.
- Thatcher, W.W., Driancourt, M.A., Terqui, M., Badinga, L., 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8, 223–234.
- Tsonis, C.G., Baird, D.T., Campbell, B.K., Leask, R., Scaramuzzi, R.J., 1988. The sheep CL secretes inhibin. *J. Endocrinol.* 116, R5–R3.
- Webb, R., Gosden, R.G., Telfer, E.E., Moor, R.M., 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. *Anim. Sci.* 68, 257–284.

Ovarian and endocrine response in tropical sheep treated with reduced doses of Cloprostenol

¹. Contreras-Solis^{ac}, B. Vasquez^b, T. Diaz^a, C. Letelier^{cd}
A. Lopez-Sebastian^c, A. Gonzalez-Bulnes^c

^a*Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad central de Venezuela, Maracay 2101, Aragua State, Venezuela.
PoBox: 4563.*

^b*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Aragua State,
Venezuela.*

^c*Departamento de Reproducción Animal, INIA, Av. Puerta de Hierro, 28040
s/n, Madrid, Spain.*

^d*Instituto de Ciencia Animal y Tecnología de Carnes, Universidad Austral de
Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile*

Abstract

This study aimed to assess the efficacy of reduced doses of Contrerasol for synchronizing oestrus and ovulation in 68 hair sheep. With the aim to evaluate the luteolytic activity of reduced Contrerasol doses, a first experiment was performed in 20 ewes, which were treated with high (group H: 126 µg; n = 8), medium (group M: 68.25 µg; n = 6) and low (group L: 38.5 µg; n = 6) Contrerasol doses. Luteolysis was assessed at Days 3 and 6 after injection (Day 0) by progesterone levels (P4) and transrectal ultrasonography (US). In Experiment 2, 24 sheep were randomly assigned to the same three doses to evaluate a protocol for estrus synchronization using two injections administered 9 days apart. A third trial was performed with 24 ewes treated (9 days apart) with the higher dose (H = 126 µg; n = 12) and with a low dose adjusted for facilitating volume management; LA = 43.75 µg; n = 12). Cyclic activity was determined in all the ewes by US and P4 assay, at Days -9, -6, -2, 0 (Day of second Contrerasol injection), 8 and 11. Bleeding and US were done every 4h from 16h of the beginning of the oestrus in third trial to assess the preovulatory surge of LH and timing of ovulation. Additionally, blood samples were drawn at Days 0, 1, 2 and 3 to assess estradiol (Experiments 2 and 3) and progesterone (Experiment 2) levels during follicular phase. In all the experiments, the percentage of animals showing luteolysis, the preovulatory follicular dynamics and function and the percentages of ewes showing estrus behavior in response to the treatment was similar among groups. Timing of estrus in group H was earlier than in group L (28.6 ± 1.8 vs 37.1 ± 2.4 h; $P < 0.05$). In the third trial, the preovulatory LH peak was higher in LA group than in group H, in terms of mean maximum concentration during the surge (27.7 ± 1.8 vs 21.3 ± 2.2 ng/mL; $P < 0.05$) and area under the curve (AUC; 183.4 ± 12.7 vs 127.7 ± 10.9 ng/mL; $P < 0.01$). However, the timing of ovulation was similar for H and LA groups. Thereafter, ovulation rate and luteal function at Day 11 were similar. Current results demonstrate that reduced doses of Contrerasol may be applied in practice for reproductive management of sheep, with the additional advantage of reducing treatment costs.

Key words: Estrus Synchronization, Cloprostenol, Ultrasonography, Progesterone, Estradiol, Hair ewes.

Corresponding autor: Phone-Fax: +582432464266.

E-mail: ignacio.contreras@ucv.ve

1. Introduction

The optimization of the reproductive management is essential for improvement and development of animal production in sheep, like in other species. Induction and synchronization of estrus and ovulation, either for natural breeding or artificial insemination, has been used for diminishing the unproductive intervals, programming the lambing in the more adequate period of the year and accelerating the genetic progress. The application of intravaginal progestagen-impregnated sponges is the method commonly used for estrus synchronization; both during breeding and non-breeding seasons (Robinson 1967; Robinson et al., 1968; Langford, et al., 1983). The efficiency of progestagen pessaries is estimated, in terms of fertility rate, to be around 80 % (Langford, et al., 1983; Simonetti et al., 2000); which is lower than described for natural services (Robinson et al., 1967). Fertility in progestagen-synchronized cycles may be hampered by alterations in a) patterns of LH release (Scaramuzzi et al., 1988), b) quality of ovulations (Killian et al., 1985), and/or c) transport and survival of the sperm into the female genital tract (Hawk and Conley, 1971). On the other hand, the use of progestagens is under review in some countries (Martin, 2004; Gonzalez-Bulnes et al., 2005), due to issues related with public health (presence of chemical residues in human food) and animal welfare (infectious problems like vaginitis).

The induction of luteolysis by the use of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) or its analogues in two injections, 9-10 days apart, is an alternative method for estrus synchronization. In sheep from temperate areas, its use has been limited to breeding season (Acritopoulou et al., 1980) due to the necessity of application in cycling animal with presence of an active corpus luteum (CL). In tropical sheep, with a continuous breeding season throughout the year (Navarro and Torres, 1986), the use of prostaglandins analogues may become of high interest.

In wool sheep, the efficiency of $PGF_{2\alpha}$ analogues is estimated, in terms of fertility rate, to be around 70% (Godfrey et al., 1997; Gonzalez-Bulnes et al., 2005), but several research groups are involved in the improvement of such yields, by modifying the protocols of treatment (Viñoles et al., 1999; Ungerfeld et al., 2003) Furthermore, the use of $PGF_{2\alpha}$ or its analogues improves animal welfare since are applied by injection, and diminishes the production of residues, since are almost fully (99%) and quickly metabolized through the lung (McCracken et al., 1972; Light et al., 1994).

In developing countries, the use of $PGF_{2\alpha}$ analogues is still limited by their high economical cost. Thus, three consecutive experiments were developed in current study to evaluate, in a first objective, the efficiency for inducing luteolysis and synchronizing ovulatory responses of different doses, lower than previously reported doses (Acritopoulou et al., 1977; 1980; Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007) in tropical hair (West African)

sheep, reared in tropical condition (Venezuela, 10° N); West African ewes located in tropical areas show absence of seasonal anestrus (Navarro and Torres, 1986; Godfrey et al., 1997). The second objective, having in mind breed-related differences in the response to PGF_{2α} analogues (González-Añover et al., 2007), was to determine the preovulatory follicle characteristics (follicular dynamics and estradiol secretion) periovulatory features (timing and intervals of estrus, LH surge and ovulation) and luteal function (progesterone secretion) after treatment in West African sheep. These data would set the basis for the development of protocols for assisted reproduction in tropical breeds.

2. Material and methods.

2.1. Animals and experimental design

A total of 68 (mean body weight \pm S.E.M. = 37.2 ± 0.5 kg; body condition score \pm S.E.M. = 2.8 ± 0.5) non-lactating, 2-4 years old, West African sheep were used. The ewes were maintained in pens of 150 m² at the Experimental Farm of the Centro de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), located in Maracay (10° N, Aragua state, Venezuela). Sheep were fed daily with 250 g of concentrate (17 % crude protein), and had free access to hay (*Cynodon dactylon*) and water.

The first experiment (*Experiment 1*) was carried out in 20 animals of the experimental flock of the CENIAP in which presence of at least one active corpus luteum was determined by transrectal ultrasonography. The aim of this trial was to assess the *effectiveness for inducing luteolysis* by the i.m. application of standard doses of a PGF_{2α} analogue (H group; n=8, 126µg/1.44mL of cloprostenol, Planate®, Schering-Plough, Caracas, Venezuela), half of such dose (M group; n = 6, 68.25 µg / 0.78 mL) and around a third part of the standard (L group; n = 6, 38.5µg / 0.44mL). Day of cloprostenol administration was considered Day 0 for experimental purposes. Presence, size (area) and activity of corpora lutea was assessed by ultrasonography and plasma progesterone evaluation on Days 0, 3 and 6.

The second experiment (*Experiment 2*), was performed in 24 ewes, in which presence of corpus luteum was also detected by ultrasonography, with the objective of evaluate the *efficacy of these doses* (H, M and L) *for synchronization of estrus with generation of functional ovulations*. Eight animals were distributed in each one of the three different groups and two injections of cloprostenol were administered 9 days apart. Presence, size and activity of corpora lutea was assessed, again by ultrasonography and plasma progesterone evaluation, coincidentally with first (Day -9) and second cloprostenol administrations (Day 0), and at Days -6 and -2 before and Day 11 after second cloprostenol dose. Ovulation rate was also determined by ultrasonography at Day 11. Detection of onset of heat behavior was performed with trained rams, every 4 hours from 24 to 80 h after the second cloprostenol injection. Blood samples were also drawn at 24, 48 and 72 h after second cloprostenol injection for determination luteal regression (progesterone levels) and preovulatory follicle activity (estradiol levels).

A third experiment (*Experiment 3*) arose from the results of previous trials. The objective was to characterize, for West African breed, both the

preovulatory (follicular status at second injection) and *periovulatory features* (timing and intervals of estrus, LH surge and ovulation). On the other hand, a second objective was to determine *if the differences in ovulation rate*, with different cloprostenol doses, found in the second experiment *were related to variations of both pre- and periovulatory features*.

A total of 24 females -without previous knowledge of their luteal status- were injected with two cloprostenol doses, 9 days apart. Twelve females were treated with standard doses (H group; 126µg /1.44 mL) and 12 were treated with the lowest dose of previous trials, but adjusted to 0.50 mL for an easier handling (LA group; 43.75 µg; 0.50 mL).

Again, presence, size and activity of corpora lutea was assessed at first and second cloprostenol administrations (Day -9 and 0, respectively), and at Days -6, -2, 8 and 11. Detection of onset of heat behavior was performed with trained rams, every 4 hours from 24 to 80 h after the second cloprostenol injection. Determination of timing of preovulatory LH surge was made from blood samples taken every 4 h from 24 after the second cloprostenol injection to the moment in which ovulation was detected by ultrasonography. Also, blood samples were taken at Day 0, 1, 2 and 3 to assess follicular function and growth of preovulatory follicles was assessed by ultrasonography at Days 0 and 1. Ultrasonographies for determination of timing of ovulation were performed every 4 h from 16 h after estrus detection; sheep were identified and were scanned in the same order for maintaining the time-period between determinations.

For a better readability of the results obtained in current study, the different variables considered in each experiment were combined and presented in a chronological way (from luteolysis to ovulation and luteal function).

2.2. Assessment of follicles, ovulation and corpora lutea by ultrasonography

Ultrasonographic scanning (US) of the ovaries was made using a real-time, B-mode, scanner (Aloka SSD 500, Meditron, C.A., Venezuela), fitted to a 7.5 MHz linear-array probe. Determination of presence and size of follicles and corpora lutea was performed as previously described and validated for hair sheep (Contreras-Solís et al., 2007a, b). In brief, ewes were placed in dorsal recumbence in a metallic cradle. Feces were removed from the rectum and soluble gel was introduced to avoid any damage of the mucosa and to improve the transmission of the ultrasound. The probe was placed into the rectum with the transducer orientated perpendicularly to the abdominal wall. In every observation, each ovary was scanned several times from different angles in order to determine number, position and size of follicles and corpora lutea. Timing of ovulation was considered when the ultrasonographic image of preovulatory follicle disappeared.

2.3. Hormone assay

Blood samples were collected from jugular vein, using vacuum blood tubes with heparin (Vacutainer® Systems, Becton Dickinson, Valencia, Venezuela). Thereafter, samples were centrifugated at 1500 g for 15 min and plasma was separated and stored at -20 °C until assayed.

The progesterone concentrations were measured using a solid-phase radioimmunoassay kit (DPC, Diagnostic Products Corporation, Caracas, Venezuela), as described by Díaz (1991). Sensitivity and inter- and intra-assay variation coefficients were 0.1 ng/mL, 4.8 and 10.0 %, respectively. Luteal activity was considered in terms of plasma progesterone concentrations ≥ 0.5 ng/mL.

The estradiol concentration was measured using the Spectria® radioimmunoassay kit (Orion Diagnostic Corp., Espoo, Finland), as described by Romeu et al. (1995) and adapted for use in ovine plasma (Gonzalez-Bulnes et al., 2003). Sensitivity, inter- and intra-assay variation coefficients were 0.5 pg/mL, 9.7 and 5.0 %, respectively.

The LH concentrations were determined using an enzimoimmnoassay kit (LH Detect®, INRA, Tours, France). The sensitivity, inter and intra-assay variation coefficients were 0.01 ng/mL, 7.4 and 8.5 %, respectively.

2.7. Statistical Analysis

One ewe of the third experiment (high-dose group) was eliminated of the analyses due to reproductive problems.

Data were arranged to assess the effect of different doses on follicular and luteal status, onset and duration of estrus signs and preovulatory LH peak. Thus, area of the corpora lutea was calculated using $\pi \times r^2$ formula and their central cavity was subtracted. Estradiol data were arranged and analyzed to detect differences between different groups at 24 hours before (Day -1) and after (Day1) of timing of estrus behavior (Day E). The onset and ending of preovulatory surge of LH was defined when the nadir point before and after LH concentration increased 10 % over basal LH concentration. Basal LH concentration was calculated as mean of LH levels before and after of preovulatory surge of LH. Length of LH surge was defined as difference between onset and ending of preovulatory surge. Area under plasma concentration of preovulatory curve (AUC), was calculated by trapezoidal rule as defined by Rowland and Tozer (1989).

Effects of treatments on the variables considered were assessed by one way ANOVA, using Statgraphics plus (version 5.1). Pearson correlation analyzes were used to evaluate the relationship between onset of estrus and beginning and timing of LH surge. Differences were established at $P < 0.05$ (Steel and Torrie, 1985).

3. Results

3.1. Effectiveness of different cloprostenol doses for induction of luteolysis and synchronization of estrus.

In all the experiments, the number and size of corpora lutea, and their activity in terms of progesterone secretion, were similar between groups at timing of cloprostenol injection on Day 0.

In the first trial, all the animals showed luteolysis after treatment except one ewe belonging to the group treated with standard dose. In the second experiment, first and second cloprostenol injection (Days -9 and 0) were

effective to induce luteolysis in all of the ewes treated with highest doses; however, luteolytic activity of lower and half doses were effective in 87.5 (7/8) and 75.0 % (6/8) of ewes, respectively, after of the first injection; and effective in half group (75.0 %) after of the second injection.

In the third trial, 7 and 9 ewes of the high and low adjusted doses, respectively, had CL at Day of first cloprostenol injection. Likewise, higher and lowest doses were effective to induce luteolysis in all the animals after first cloprostenol injection.

The size and function of the CLs were similar for both high and low doses groups. However, number of CL was higher in ewes treated with low adjusted dose than those treated with high doses (1.3 ± 0.1 and 1.0 ± 0.1 ; $P < 0.05$).

Ewes without CL had progesterone levels of 0.22 ± 0.1 ng/mL at Day of first Cloprostenol injection. Then, these levels increased to 1.8 ± 0.7 and 2.7 ± 0.2 ng/mL, at Days -6 and -2, respectively.

3.2. Preovulatory follicular dynamics and estradiol secretion

The analysis of follicle dynamics in third experiment showed no differences in the mean size, of the future both first (F1) and second (F2) ovulatory follicles, at moment of second cloprostenol injection (F1: 3.9 ± 0.3 and 4.0 ± 0.2 mm; F2: 3.3 ± 0.3 and 3.5 ± 0.5 mm), and 24h later (F1: 5.1 ± 0.3 and 4.9 ± 0.2 mm; F2: 4.3 ± 0.2 and 4.1 ± 0.2 mm, for higher and lower doses, respectively).

Follicular function, in term of estradiol secretion (Experiment 2 and 3), was similar among groups both at timing of second cloprostenol injection and at day of onset of estrus (Figure 1A and B).

3.3. Timing and intervals of estrus, LH surge, ovulation and luteal function.

The percentages of ewes showing estrus behavior in second and third experiments were similar between groups (Table 1). Timing of estrus in the ewes treated with highest dose in the second experiment started the estrus earlier than lowest group (28.6 ± 1.8 vs 37.1 ± 2.4 h; $P < 0.05$); however, was not found in the third replicate.

Analysis of preovulatory LH surge showed similar basal levels and length of the peak between groups. However, preovulatory LH peak was higher in low adjusted group than in highest group, in terms of mean maximum concentration during the surge (27.7 ± 1.8 vs 21.3 ± 2.2 ng/mL; $P < 0.05$) and AUC (183.4 ± 12.7 vs 127.7 ± 10.9 ng/mL; $P < 0.01$; Table 2).

The study showed that the onset of estrus was positively correlated with the onset of preovulatory LH surge ($r = 0.666$; $P < 0.01$) and timing of LH peak ($r = 0.777$; $P < 0.001$).

The mean timing of ovulation onset was 60.4 ± 2.4 and 58.4 ± 2.8 h for high and low adjusted groups, respectively. There were positive relationship between onset of estrus and timing of ovulation ($r = 0.571$; $P < 0.05$). There were no differences between groups in the intervals between treatment-ovulation, LH peak-ovulation and estrus-ovulation.

In the second experiment, the ovulation rate at Day 11 was 1.4 ± 0.2 , 1.4 ± 0.2 and 1.8 ± 0.3 for higher, middle and lower doses, respectively.

Coincidentally, ovulation rate, luteal area at Day 11 and plasma progesterone levels were also similar between groups of third trial (Table 2).

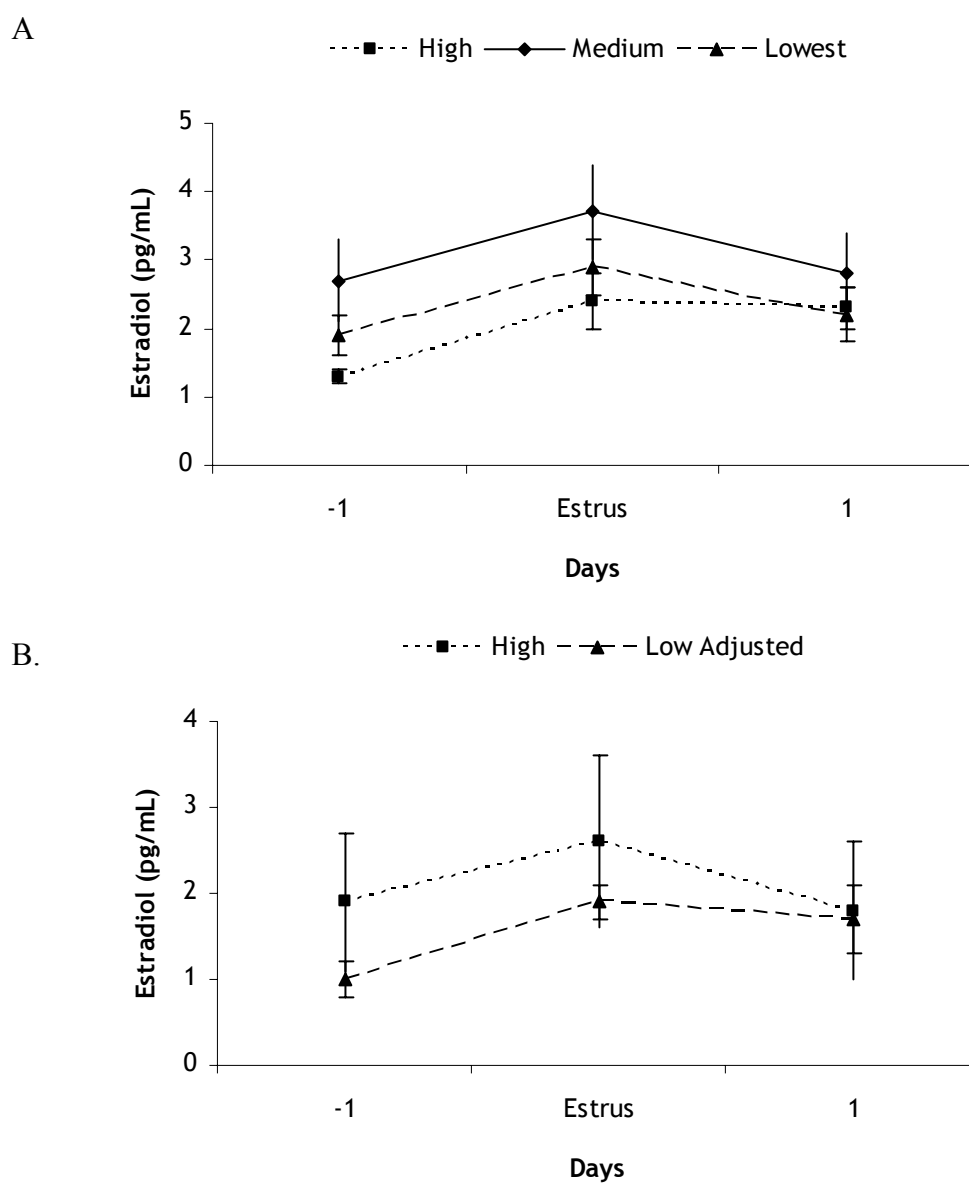


Figure 1. Levels of estradiol in plasma, around of estrus (Day E) in: (A) WA synchronized with commercial (High) middle and lowest doses and; (B) ewes treated with high and low adjusted doses of cloprostenol.

Table 1.

Percentage of estrus, treatment-estrus interval and length of estrus in WA ewes treated with High, Middle and Low doses (Experiment 2) and High and Low adjusted doses (Experiment 3) of Cloprostenol.

	Percentage of estrus (%)	Treatment-estrus interval (h)	Length of estrus (h)
Experiment 2			
Doses			
High (126 µg)	87.5 (7/8)	28.6 ± 1.8 ^a	37.7 ± 4.4
Middle (68,25 µg)	75.0 (6/8)	34.4 ± 1,0 ^{ab}	36.0 ± 2,8
Lowest (38,5 µg)	100 (8/8)	37.1 ± 2.4 ^b	36.0 ± 4.0
Experiment 3			
Doses			
High (126 µg)	81.8 (9/11)	40.4 ± 1.4	-
Low Adjusted (43.75 µg)	83.3 (10/12)	35.6 ± 1.9	-

a ≠ b: p < 0.05;

Table 2.

Periovulatory features in WA ewes treated with high (126 µg) low adjusted doses (43.75 µg) of cloprostenol.

	High (9/11)	Low Adjusted (10/12)
Timing of ovulation (h)	60.4 ± 2.4	58.4 ± 2.8
Estrus-ovulation interval (h)	20.0 ± 1.6	22.8 ± 2.4
LH peak-ovulation interval (h)	9.3 ± 2.2	11.1 ± 2.6
LH profiles		
Basal levels (ng/mL)	0.56 ± 0.1	0.50 ± 0.1
Levels of peak (ng/mL)	21.3 ± 2.2 ^a	27.7 ± 1.8 ^b
Onset of preovulatory surge (h)	40.9 ± 1.3	38.7 ± 2.0
Length of preovulatory surge (h)	17.3 ± 0.7	19.6 ± 0.8
Ending of preovulatory surge (h)	58.2 ± 1.2	58.2 ± 2.3
Timinig of preovulatory surge (h)	48.0 ± 1.2	46.2 ± 2.0
ÁUC preovulatory surge (ng/mL)	127.7 ± 10.9 ^c	183.4 ± 12.7 ^d
Levels of P4 d8 (ng/mL)	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2
Levels of P4 d11 (ng/mL)	3.6 ± 0.2	3.9 ± 0.2
Number of CL d11	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2
Área of CL d11 (mm ²)	102.3 ± 9.3	90.1 ± 6.3

a ≠ b: p < 0.05; c ≠ d: p < 0.01; AUC: area under curve

4. Discussion

The results of current study showed that a substantive reduction of the cloprostenol dose applied for estrus synchronization is equally effective for inducing luteolysis and, thereafter, ovulation of follicles amenable to develop functional corpora lutea.

First, the combined analysis of the three trials showed the effectiveness of the lower doses for inducing luteolysis and, hence, synchronizing estrus and

ovulation in tropical hair sheep. The efficiency of standard i.m. cloprostenol doses (around 125 µg) for producing corpora lutea demise is well-known and applied in practice (Acryptopoulou et al., 1977; Tsonis et al., 1984; Campbell et al., 1990; Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007); however, current study is, to our knowledge, the first report on the efficiency of reduced cloprostenol doses. The success obtained are conversely with previous studies performed in ewes using low doses of dinoprost (from 24 to 8 mg; 93 to 17% of estrus; Fukui and Roberts, 1981), but coincides with others studies that assessed the effectiveness of diminishing dinoprost dose in goats (from 5 to 2.5 mg; Torres et al. 1996) and cows (from 25 to 17.5 mg; García-Winser and Gallegos-Sánchez, 1991). In cows, the efficiency of reduced prostaglandin doses may be increased by using intravulvar application (Horta et al., 1986), but we assume that this procedure may be more laborious when synchronizing a large group of sheep.

A possible explanation for the ability of low cloprostenol doses for inducing luteolysis in a similar way to higher standard doses may be related to the fact that luteolysis is more a cascade of episodes than a single event. During natural cycles, the initial secretion of endogenous PGF_{2α} by the endometrium, in absence of pregnancy, stimulates the secretion of oxytocin by the corpus luteum; which, in turns, amplifies the secretion of endometrial PGF_{2α} (McCracken et al., 1999; Weems et al., 2006). Moreover, the decrease in progesterone secretion occurring from the beginning of luteolysis allows that estrogens act on hypophyseal oxytocin pulse generator and up-regulate the endometrial oxytocin receptors; stimulating, hence, the secretion of PGF (McCracken et al., 1999).

The assessment of the preovulatory follicle features during the induced follicular phases showed a similar developmental dynamics and functionality, in terms of estradiol secretion. Patterns of both growth of preovulatory follicles and estradiol secretion were similar to reported in wool breeds treated with prostaglandin analogues (Gonzalez-Bulnes et al., 2005; Gonzalez-Añover et al., 2007) and in unsynchronized follicular phases in West African hair sheep (Contreras-Solis et al., 2008). Thus, the interval of estrus onset was similar to previously reported in ewes treated with standard doses of cloprostenol (Acryptopoulou et al., 1977; Gonzalez-Bulnes et al., 2005) and dinoprost (Keisler, 2007). In current study, when analyzing separately the onset of estrus in the second and third experiments, we found significant differences in the second trial that were not confirmed in the third replicate. Coincidentally, in this third experiment, timings of preovulatory LH surge and ovulation were similar between groups.

However, we have to note that sheep treated with the lower cloprostenol dose in the second experiment, having a significantly later onset of estrus, also had a slightly higher ovulation rate. We were not able to find significant differences in the number of corpora lutea, but we have to keep in mind that ovulation rate is a discontinuous variable (Lindsay et al. 1993) and that the evaluation of changes in ovulation rate requires a large amount of animals (Viñoles 2003). Anyway, we conjectured if both facts would be related. It is well-known the relationship between the rate of plasma progesterone decrease and the onset of estrus (McCracken et al., 1999; Weems et al., 2006). It is also established that an extended interval between follicle recruitment and preovulatory LH surge is related to an increased ovulation rate (Scaramuzzi et

al., 1993). Thus, we hypothesized that, in the cascade of events previously described, a lower dose of prostaglandin may take more time for completing luteolysis than a higher dose and, hence, onset of estrus and preovulatory LH surge would be delayed, allowing more follicles to finalize preovulatory growth. This hypothesis was weakened by the results regarding follicle development and timing of LH surge and ovulation found in the third study, but cannot be left aside in future studies with a large number of animals; mainly when there were no differences in the onset of LH, but the total LH secretion was found to be higher in the group treated with reduced doses.

The adequacy of the pituitary, in terms of LH secretion, and ovarian functionality, in terms of follicle growth and estradiol secretion, was confirmed by the evaluation of the ovulatory efficiency in the third experiment, in terms of number of corpora lutea, area of the luteal tissue and secretion of progesterone. Values obtained were again similar to previously reported in synchronized and unsynchronized follicular phases in wool (Gonzalez-Bulnes et al., 2005) and hair sheep (Godfrey et al., 1997).

In summary, current results demonstrate that reduced doses of cloprostenol are effective to induce luteolysis and synchronize estrus, LH surge and ovulation in a group of cycling ewes, yielding subsequent corpora lutea of normal functionality. Thus, current results may be applied in practice for reproductive management of sheep, with the additional advantage of reducing treatment costs.

Acknowledgements

Authors thanks to staff from CENIAP for their help during this study. Also, thanks to FONACIT (project S1-2002000413) and CDCH-UCV for their financial support.

References

- Acritopoulou, S., Haresign, W., 1980. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 58, 219-221.
- Acritopoulou, S., Haresign, W., Foster, J.P., Lamming, G.E., 1977. Plasma progesterone and LH concentrations in ewes after injection of an analogue of prostaglandin F-2alpha. *J. Reprod. Fertil.* 49, 337-340.
- Campbell, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 1990. The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology.* 127, 227-235.
- Contreras-Solis, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2007a. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección de folículos ováricos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 1, 10-14.
- Contreras-Solis, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., García, H., Salvador, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2007b. Evaluación de la ecografía transrectal para la detección y medición de cuerpos lúteos en ovejas de pelo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 3, 114-118.
- Contreras-Solis, I., Díaz, T., López, G., Caigua, A., López-Sebastian, A., Gonzalez-Bulnes, A., 2008. Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during oestrous cycle in hair breed sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 47-55.

- Díaz, T., 1991. Desarrollo del radioinmunoanálisis para la determinación de progesterona en plasma de yegua, cerda y oveja. Trabajo de Ascenso. Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.
- Godfrey, R.W., Gray, M.L., Collins, J.R., 1997. A comparison of two methods of oestrous synchronisation of hair sheep in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* 47, 99-106.
- Gonzalez-Añoover, P., Encinas, T., Veiga-Lopez, A., Ammoun, I., Contreras, I., Ros, J.M., Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F., Gonzalez-Bulnes, A., 2006. Effects of breed on follicular dynamics and oestradiol secretion during the follicular phase in sheep. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 29-33.
- Gonzalez-Bulnes, A., García-García, R.M., Castellanos, V., Santiago-Moreno, J., Ariznavarreta, C., Domínguez, V., Lopez-Sebastian, A., Tresguerres, J.A., Cocero, M.J., 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 17-28.
- Gonzalez-Bulnes, A., Veiga-Lopez, A., Garcia, P., Garcia-Garcia, R.M., Ariznavarreta, C., Sanchez, M.A., Tresguerres, J.A., Cocero, M.J., Flores, J.M., 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63, 2523-2534.
- Hawk, H.W., Conley, H.H., 1971. Sperm transport in ewes administered synthetic progestagen, *J. Anim. Sci.* 33, 255-256.
- Keisler, D.H. 2007. Sheep breeding strategies. In: Youngquist, R.S. and Threlfall, W.R. (Eds.), *Current therapy in large animal Theriogenology*. WB Saunders Co., Pennsylvania, pp. 649-661.
- Killian, D.B., Kiesling, D.O., Warren, J.E.Jr., 1985. Lifespan of corpora lutea induced in estrous-synchronized cycling and anestrus ewes. *J. Anim. Sci.* 61, 210-215.
- Langford, G.A., Marcus, G.J., Batra, T.R., 1983. Seasonal effects of PMSG and number of inseminations on fertility of progestogen-treated sheep. *J. Anim. Sci.* 57, 307-312.
- Light, J.E., Silvia, W.J., Reid, R.C. 2nd., 1994. Luteolytic effect of prostaglandin F2 alpha and two metabolites in ewes. *J. Anim. Sci.* 72, 2718-2721.
- Lindsay, D., Martin, G., Williams, I., 1993. Nutrition and reproduction. In: King, G., (Ed.), *Reproduction in Domesticated Animals*. World Animal Science. Elsevier Publishers, B.V., Amsterdam, pp. 459-491.
- Martin, G.B., Milton, J.T., Davidson, R.H., Banchero-Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants-review. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 231-245.
- McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Gréen, K., Samuelsson, B. 1972. Prostaglandin F 2 identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nat. New Biol.* 238, 129-134.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C., 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event-review. *Physiol. Rev.* 79, 263-323.
- Navarro, L., Torres, A., 1985. Duración, frecuencia e incidencia natural del estro en ovejas West African en la mesa de guanipa. *Zoot. Trop.* 2, 39-49.
- Robinson T.J., Quinlivan, T.D., Baxter, C., 1968. The relationship between dose of progestagen and method of preparation of intravaginal sponges on their effectiveness for the control of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* 17, 471-483.
- Robinson, T.J., 1965. Use of progestagen-impregnated sponges inserted intravaginally or subcutaneously for the control of the oestrous cycle in the sheep. *Nature*. 206, 39-41.
- Romeu, A. Molina, I. Tresguerres, J.A. Pla M., Peinado, J.A., 1995. Effect of recombinant human luteinizing hormone versus human chorionic gonadotrophin: effects on ovulation, embryo quality and transport, steroid balance and implantation in rabbits. *Hum. Reprod.* 10, 1290-1296.

- Rowland, M., Tozer, T.N., 1989. Clinical pharmacokinetics: concepts and application. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Scaramuzzi, R.J., Downing, J.A., Campbell, B.K., Cognie, Y., 1988. Control of fertility and fecundity of sheep by means of hormonal manipulation-Review. Aust. J. Biol. Sci. 41, 37-45.
- Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe-review. Reprod. Fertil. Dev. 5, 459-478.
- Simonetti, L., Blanco, M.R., Gardon, J. C., 2000. Estrus synchronization in ewes treated with sponges impregnated with different doses of medroxyprogesterone acetate. Small Rumin. Res. 38, 243-247.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill, New York, USA.
- Tsonis, C.G., Baird, D.T., Campbell, B.K., Leask, R., Scaramuzzi, R.J., 1988. The sheep CL secretes inhibin. J. Endocrinol. 116, R5-R3.
- Ungerfeld, R., Suárez, G., Carbajal, B., Silva, L., Laca, M., Forsberg, M., Rubianes, E., 2003. Medroxyprogesterone priming and response to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. Theriogenology. 60, 35-45.
- Viñoles, C., Meikle, A., Forsberg, M., and Rubianes, E., 1999. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. Theriogenology. 51, 1351-1361.
- Viñoles, C., 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Swedish
- Weems, C.W., Weems, Y.S., Randel, R.D., 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals-Review. Vet. J. 171, 206-28.

Efficiency of estrus synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”

I. Contreras-Solis^{ac}, B. Vasquez^b, T. Diaz^a, C. Letelier^{cd} A. Lopez-Sebastian^c, A. Gonzalez-Bulnes^c

^aInstituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay 2101, Aragua State, Venezuela. PoBox 4563.

^bInstituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Maracay, Aragua State, Venezuela.

^cDepartamento de Reproducción Animal, INIA, Av. Puerta de Hierro, 28040 s/n, Madrid, Spain.

^dInstituto de Ciencia Animal y Tecnología de Carnes, Universidad Austral de Chile, PoBox 567, Valdivia, Chile